

01.12.2004



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 15 DEC 2004  
WIPO PCT

## CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de  
la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200302368 , que  
tiene fecha de presentación en este Organismo 3 de Octubre de 2003

Madrid, 10 de Noviembre de 2004

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica

P.D.

C.6

CARLOS GARCÍA NEGRETE



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
TECNOLOGÍA

20



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

# INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD

P 200302368

MODALIDAD:

PATENTE DE INVENCIÓN

MODELO DE UTILIDAD

TIPO DE SOLICITUD:

ADICIÓN A LA PATENTE

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

SOLICITUD DIVISIONAL

MODALIDAD

CAMBIO DE MODALIDAD

Nº SOLICITUD

TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

FECHA SOLICITUD

PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

CER, S.A.

NOMBRE

ESPAÑOLA

DNI/CIF

A-08084238

CNAE

PYME

DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO Sardenya, 350

LOCALIDAD BARCELONA

PROVINCIA BARCELONA

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO

FAX

CORREO ELECTRÓNICO

CÓDIGO POSTAL 08025

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO

PAÍS

REPOLLES MOLINER

JOSÉ  
EDUARDO  
FRANCISCO

ESPAÑOLA  
ESPAÑOLA  
ESPAÑOLA

SALAS PÉREZ-RASILLA

PUBILL COY

ES

ES

EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

INVENC. LABORAL

CONTRATO

SUCESIÓN

I) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:

"Derivados de disulfuro, sulfuro, sulfóxido y sulfona de azúcares cíclicos y sus usos"

) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

SI

NO

) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

I) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

NÚMERO

FECHA

I) EL SOLICITANTE SE ACODE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

5) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) ( RELLENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

Pedro SUGRAÑES MOLINE - calle Provença, 304 - 08008 BARCELONA (España) - Agente 300-X

3) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 37

Nº DE REIVINDICACIONES: 33

DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS:

LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:

RESUMEN

DOCUMENTO DE PRIORIDAD

TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

OTROS:

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

PEDRO SUGRAÑES MOLINÉ  
p.p.  
Colegiado N° 180

Foto.: Enrique Vélez

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, á los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

AL SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

formacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCAOS EN ROJO.



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P 2 0 0 3 0 2 3 6 8

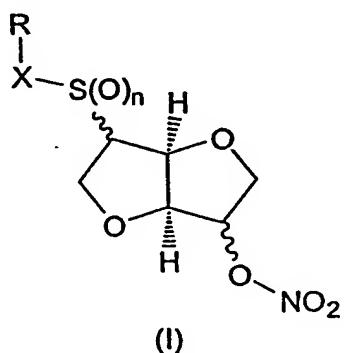
FECHA DE PRESENTACIÓN

## RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Derivados de disulfuro, sulfuro, sulfóxido y sulfona de azúcares cílicos y sus usos"

Derivados de mononitrato de dianhidrohexitol y sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico correspondientes a la fórmula (I)



Composiciones farmacéuticas que contengan estos compuestos y sus usos.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



(12)

## SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

(31) NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

(32) FECHA

(33) PAÍS

(21)

NÚMERO DE SOLICITUD

(22)

FECHA DE PRESENTACIÓN

(62)

PATENTE DE LA QUE ES  
DIVISORIA

(1) SOLICITANTE (S)

LACER, S.A.

DOMICILIO Sardenya, 350 - 08025 BARCELONA

NACIONALIDAD Española

(12) INVENTOR (ES) (1) JOSÉ REPOLLES MOLINER, (2) EDUARDO SALAS PÉREZ-RASILLA y (3) FRANCISCO PUBILL COY

(5) Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

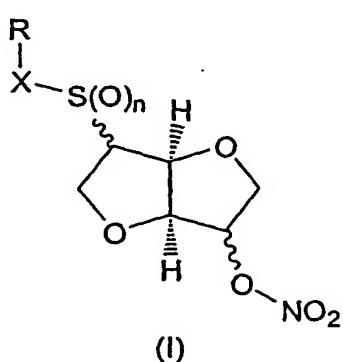
(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN

Derivados de disulfuro, sulfuro, sulfóxido y sulfona de azúcares cílicos  
sus usos"

(57) RESUMEN

"Derivados de disulfuro, sulfuro, sulfóxido y sulfona de azúcares cílicos y sus usos"

Derivados de mononitrato de dianhidrohexitol y sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico  
correspondientes a la fórmula (I)



composiciones farmacéuticas que contengan estos compuestos y sus usos.

## DESCRIPCION

### **Derivados de Disulfuro, Sulfuro, Sulfóxido y Sulfona de Azúcares Cílicos y sus usos**

5

#### Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a derivados de disulfuro, sulfuro, sulfóxido y sulfona de mononitrato de 1,4:3,6 dianhidrohexitol y su uso para la prevención y / o tratamiento de trastornos cardiovasculares.

#### Fundamentos técnicos

El óxido nítrico (NO) es una de las moléculas activas biológicamente más pequeñas y simples que podemos encontrar en la naturaleza. Además, el NO parece ser una de las moléculas más ubicuas en los mamíferos. Al ser una de las moléculas de señalización de uso más generalizado, el NO tiene una gran importancia en el control de prácticamente todas las funciones orgánicas y celulares del cuerpo. El NO es la única molécula endógena capaz de funcionar como un neurotransmisor, autacoid, mediador constitutivo, mediador inducible, molécula citoprotectora y molécula citotóxica.

Dado que el NO desempeña múltiples acciones fisiológicas en la regulación de numerosas y diversas funciones orgánicas, los defectos en la ruta del NO conllevan el desarrollo de diferentes condiciones patológicas. Estos trastornos incluyen la hipertensión, aterosclerosis, enfermedades de las arterias coronarias, insuficiencia cardiaca, hipertensión pulmonar, ictus, impotencia, complicaciones vasculares de la diabetes mellitus, úlceras gastrointestinales, asma y otros trastornos del sistema nervioso central y sistémico.

30

Todos los donadores de óxido nítrico (DNOS) comparten la propiedad común de producir actividad relacionada con el NO cuando se aplican en sistemas biológicos y, por tanto, mimetizan las respuestas al NO endógeno. No obstante, los procesos que llevan a la formación/liberación del NO difieren de manera significativa entre las 35 clases de compuestos , al igual que entre sus reactividades químicas: Mientras que

algunos compuestos requieren catálisis enzimática, otros producen NO de manera no enzimática. Algunos DNOs requieren interacción con tioles para liberar NO, mientras que otros son generadores espontáneos de NO. En algunos compuestos, la liberación de NO es precedida por una reducción o por una oxidación. El proceso

- 5 se complica aún más por la susceptibilidad específica de los compuestos a los cambios en el pH, oxígeno, luz y temperatura y por la formación de diferentes sub-  
productos que se produce durante la descomposición o el metabolismo. Además, la  
cinética de la liberación de NO a partir de un compuesto determinado es, a menudo,  
más importante que la cantidad absoluta de NO liberado. Es más, la distribución  
10 tisular de los DNOs y el lugar en el que se genera el NO es también muy importan-  
te. Todas estas consideraciones son importantes, pues explican los muy diferentes  
perfiles farmacológicos obtenidos con los distintos DNOs descritos en la bibliografía  
y hace necesario caracterizar completamente el perfil farmacológico de los nuevos  
DNOs en investigación y desarrollo.

15

DNOs basados en una estructura de mononitrato de isosorbida que son útiles des-  
de un punto de vista farmacéutico aparecen descritos en WO 00/20420. Esta solici-  
tud de patente describe nitratos orgánicos capaces de proporcionar un potente  
efecto vasodilatador y que, al mismo tiempo, generan poca o nula tolerancia. Sin  
20 embargo, no existe indicación alguna sobre el posible uso de dichos compuestos  
para el tratamiento de la activación de plaquetas, trombosis, ictus, daño tisular de-  
bido a isquemia y / o isquemia / reperfusión; condiciones patológicas en las que el  
estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis; y / o ateroscle-  
rosis.

25

Uno de los principales problemas de los nitratos orgánicos descritos en la literatura  
y de aquellos utilizados clínicamente reside en el hecho de que su mecanismo de  
acción radica en la relajación del músculo liso vascular sin modificar otros procesos  
patológicos involucrados en las enfermedades cardiovasculares.

30

La isquemia tisular resulta en la depleción de las reservas intracelulares de adeno-  
sina-trifosfato (ATP), lo que consecuentemente compromete el funcionamiento de la  
bomba iónica dependiente del ATP asociada a la membrana en las células endote-  
liales. Esta disfunción de la membrana permite la entrada de calcio, sodio y agua en

- 35 las células. La resultante acumulación de calcio y otros iones en la célula puede  
derivar en una tumefacción celular y en la inapropiada activación de las enzimas

celulares. Una enzima que se activa por el aumento del calcio intracelular durante la isquemia es la xantina deshidrogenasa (XDH). En condiciones normales, la XDH oxida la hipoxantina (un producto de descomposición en el metabolismo del ATP) de una manera dependiente de NADPH para producir xantina y ácido úrico. Sin

- 5 embargo, durante la condición hipóxica de la isquemia, los niveles de hipoxantina aumentan dentro de la célula debido a la hidrólisis de ATP y se produce una activación dependiente del calcio de las proteasas que convierte a la XDH reductora de NADPH en una forma de enzima reductora de oxígeno denominada xantina oxidasa (XO). Al producirse el restablecimiento del flujo de sangre (reperfusión) al tejido y  
10 con la reintroducción de oxígeno molecular, la XO convertirá la hipoxantina en xantina y ácido úrico y ello catalizará la reducción de oxígeno molecular para formar tanto radicales superóxidos de anión ( $O_2^-$ ) como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este mecanismo de producción de radicales de oxígeno dependiente de la XO ha sido  
15 invocado para explicar la participación del  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  en las lesiones de la reperfusión producidas en una variedad de órganos, incluyendo el intestino, el cerebro, el corazón y el músculo esquelético.

- La generación de radicales de oxígenos en tejidos post-isquémicos parece sobre-  
pasar la capacidad de los antioxidantes endógenos tales como la superóxido dismu-  
20 tasa (SOD), catalasa, glutationa para proteger las células endoteliales y parenqui-  
matosas. Los antioxidantes exógenos tales como el SOD y la catalasa han demo-  
strado atenuar la infiltración de leucocitos y las lesiones a tejidos producidas por la  
isquemia y la reperfusión.

- 25 La biodisponibilidad del óxido nítrico parece estar reducida en la reperfusión, lo que probablemente se deba a un deterioro de la producción endotelial de NO y a una inactivación aumentada de NO por el  $O_2^-$  derivado de células endoteliales. La bio-  
disponibilidad limitada del NO contribuye a las interacciones anormales célula-  
célula y a la disfunción vascular durante la reperfusión. Los donadores de óxido  
30 nítrico han demostrado resultados prometedores como agentes protectores en mo-  
delos experimentales de isquemia-reperfusión. No obstante, considerando los pro-  
cesos involucrados en los daños producidos por la isquemia-reperfusión, sería muy  
interesante disponer de una molécula con ambas propiedades: que fuera donador  
de NO y que, al mismo tiempo, tuviera propiedades antioxidantes.

La aterosclerosis es un proceso activo originado por el daño continuo del endotelio vascular. Se desarrolló la hipótesis de la aterosclerosis como respuesta al daño del endotelio cuando se estudió la asociación de aterosclerosis con factores de riesgo (niveles plasmáticos elevados de LDL, bajos niveles plasmáticos de HDL, hipertensión, estrés oxidativo, tabaquismo, diabetes mellitus, niveles plasmáticos elevados de Lp(a) o modificaciones de la LDL tales como oxidación o glicosilación que evitan la eliminación de LDL por los receptores específicos). La LDL se acumula en la pared vascular como consecuencia de un transporte activo de células endoteliales. Durante este proceso, la LDL sufre la oxidación de una parte de la molécula. La presencia de LDL oxidada (ox-LDL) es de vital importancia para el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. En el mismo sentido, la teoría de que la LDL oxidada es responsable de algunas de las características patológicas de las lesiones ateroscleróticas deriva de los hallazgos en sistemas de células en cultivo que revelan que la LDL oxidada causa cambios celulares que se correlacionan con aspectos conocidos de las lesiones arteriales pero que no están inducidos por la LDL nativa. La lesión endotelial, la retención de LDL en el intersticio de íntima, el reclutamiento de monocitos en la íntima, el enriquecimiento de los macrófagos con lípidos derivados de lipoproteínas, la migración y proliferación de células musculares lisas, la acumulación de detritus de células necróticas y las tendencias hacia la vasoconstricción y la actividad pro-coagulante son características de la aterosclerosis.

La vasculopatía del trasplante alogénico cardíaco es una forma inusualmente acelerada y difusa de aterosclerosis coronaria que limita el éxito a largo plazo del trasplante de corazón. La disfunción vasodilatadora del endotelio coronario es un marcador común y temprano para el desarrollo de vasculopatía del trasplante alogénico.

Por tanto, nuevos nitratos orgánicos que, además de su actividad vasodilatadora, podrían combinar actividades que les permitieran modificar otros procesos patológicos que forman parte de las enfermedades cardiovasculares, tales como la aterosclerosis y el daño tisular debido a la isquemia y / o a la isquemia y a la reperfusión, supondrían un gran avance con respecto a los compuestos utilizados hoy en día.

**Resumen de la invención**

Un objeto de la invención es un novedoso tipo de compuestos, derivados del mononitrato de dianhidrohexitol, que son capaces de proporcionar un potente efecto vasodilatador y que, al mismo tiempo, modifican otros procesos patológicos involucrados en las enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, vasculopatía

- 5      dos en las enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, vasculopatía del trasplante alogénico y daño tisular debido a isquemia y / o isquemia-reperfusión.

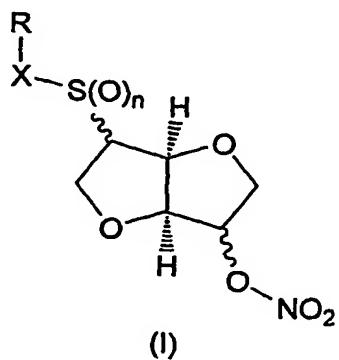
Otro objeto de la invención es un novedoso tipo de compuestos, derivados del mononitrato de dianhidrohexitol, que son capaces de proporcionar un potente efecto  
10     10 antitrombótico incluso a una dosis que no modifica la tensión arterial.

Otro objeto de la invención es un novedoso tipo de compuestos, derivados del mononitrato de dianhidrohexitol, que son capaces de proporcionar una sinergia con fármacos trombolíticos, anticoagulantes, antitrombóticos, antioxidantes e hipolipemiantes.  
15     15

Otro objeto más de la presente invención tiene que ver con el uso de los derivados del mononitrato de dianhidrohexitol para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de trastornos cardiovasculares relacionados con la aterosclerosis.  
20

**Descripción detallada de la invención**

Los derivados del mononitrato de dianhidrohexitol y sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, que son un objeto de la presente invención, corresponden a la siguiente fórmula(I)  
25



donde

n es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

X representa  $-S(O)_m-$ ,  $-(C=O)-$  o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, ó 2,

5

y R representa hidrógeno o un residuo seleccionado de entre:

C<sub>1-6</sub> alquilo;

C<sub>2-6</sub> alquenilo;

C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;

10 C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;

C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;

C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;

15 fenilo;

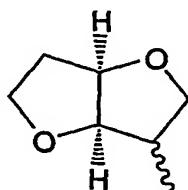
piridilo;

tiofenilo;

nitrosilo;

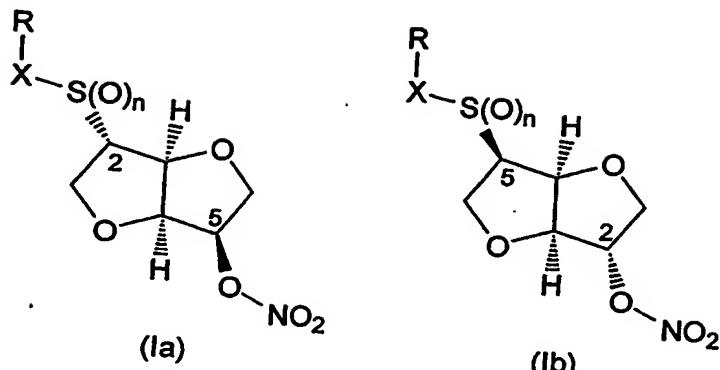
S-cisteinil;

20 S-glutationil; y



25 y este último residuo puede estar opcionalmente sustituido hasta por tres grupos independientes seleccionados de entre C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquelino, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno.

30 En los componentes incluidos en la fórmula (I) en la que RXS(O)<sub>n</sub>- y -ONO<sub>2</sub> tienen forma trans para cada uno en lo que respecta al plano del anillo, tal y como se describe en las fórmulas (Ia) y (Ib):



teniendo en cuenta que  $\text{RXS}(\text{O})_n-$  no representa  $\text{Z}-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-$ , donde Z es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, grupo aril o grupo aralquil, el cual puede ser eventualmente sustituido.

5

Sorprendentemente, los compuestos de la fórmula I, además del potente efecto vasodilatador con tolerancia pequeña o nula, poseen propiedades anti-activación de las plaquetas, anti-trombótica, anti ictus, antioxidante, anti lesión / daño tisular debido a isquemia y / o isquemia / reperfusión y propiedades anti-ateroscleróticas.

10

Otra incorporación de la presente invención tiene que ver con una composición farmacéutica que incluye los derivados de mononitrato dianhidrohexitol anteriormente mencionados y sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de acuerdo con la fórmula (I).

15

Otra incorporación de la presente invención tiene que ver con el uso de los derivados de mononitrato dianhidrohexitol y sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de acuerdo con la fórmula (I) para la fabricación de compuestos farmacéuticos para la prevención y / o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, disfunciones del sistema circulatorio, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en sus patogénesis, tales como pero sin limitarse a ella, la enfermedad de Alzheimer, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis y / o daño tisular debido a isquemia y / o debido a isquemia – reperfusión.

Las expresiones empleadas anteriormente serán explicadas con mayor detalle a continuación:

- 5 El término "halógeno" se refiere al flúor, cloro, bromo o yodo, de entre los que se prefiere el bromo.

El término "C<sub>1-6</sub> alquilo", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que cuenta con entre 1 y 6 átomos

- 10 de carbono, incluyendo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo y hexilo.

El término "C<sub>2-6</sub> alquelino", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo alquelino de cadena lineal o ramificada que cuenta con entre 2 y 6

- 15 átomos de carbono y al menos un doble enlace de estereoquímica E o Z, según proceda. Este término incluirá, por ejemplo, vinilo, alilo, 1- y 2- butenilo y 2-metil-2-propenilo...

El término "C<sub>3-8</sub> cicloalquilo", tal y como se utiliza en el presente documento, se

- 20 refiere a un grupo alicíclico que cuenta con entre 3 y 8 átomos de carbono. Algunos ejemplos ilustrativos de dichos grupos cicloalquilos son ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

De acuerdo con esto, el término "C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>", se refiere a un grupo alicíclico que cuenta con entre

- 25 3 y 8 átomos de carbono donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>. Algunos ejemplos ilustrativos de esos grupos son tetrahidropirano, tetrahidofurano, pirrolidino, piperidino y tetrahidrotiofeno.

- 30 El término "C<sub>4-8</sub> cicloalquelino" se refiere a un grupo alicíclico que cuenta con entre 4 y 8 átomos de carbono. Algunos ejemplos ilustrativos de dichos grupos cicloalquelinos son ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo y ciclooctenilo.

- 35 Se prefiere que R represente el hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo)C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo)C<sub>4-8</sub>

cicloalquelino, fenilo o (C<sub>1-6</sub> alquilo)fenilo, mientras que C<sub>1-6</sub> alquilo es especialmente preferible.

También se prefiere que en la fórmula (I) m, n o ambos sean 0.

5

También se prefiere que X represente un enlace sencillo o -S-.

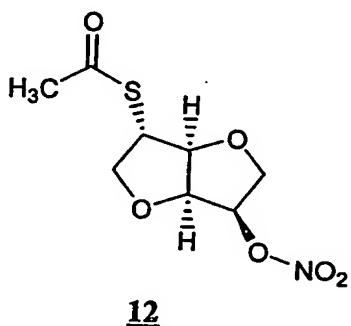
Los compuestos especialmente preferidos de la fórmula I son:

2-tiosorbida 5-mononitrato, 5,5'-dinitrato-2,2'-ditio-diisosorbida, 2-metiltiosorbida 5-mononitrato, 2-metil-sulfinilosorbida 5-mononitrato, 2-metilsulfonilosorbida

10 5-mononitrato, S-nitroso-2-tiosorbida 5-mononitrato, 2-(tetrahidropiran-2-il-tio)-isosorbida 5-mononitrato, 2-(iso-sorbitil-2'-ditio)-isosorbida 5-mononitrato, y 2-(5'-acetiloxiisosorbidil-2'-ditio)-isosorbida 5-mononitrato.

15 Además, para la fabricación de compuestos farmacéuticos para la prevención y/o el tratamiento de la trombosis, isquemia, daño celular/tisular inducido por isquemia y / o isquemia y reperfusión, hipertensión, espasmos vascular, aterosclerosis y / o vasculopatía del trasplante cardiaco, se prefiere especialmente el uso de 2-acetiltiosorbida-5-mononitrato (compuesto (12)) y sus sales farmacéuticamente aceptables:

20



12

Adicionalmente, los compuestos de la fórmula I, especialmente 2-acetiltiosorbida-5-mononitrato (12), y sus sales, también pueden utilizarse en la terapia para la prevención y / o tratamiento de la aterosclerosis, vasculopatía del trasplante cardiaco, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las

que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en su patogénesis, y / o daño tisular debido a isquemia y / o isquemia-reperfusión. Estos compuestos pueden ser utilizados especialmente en la prevención y/o el tratamiento de condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en su 5 patogénesis, tales como alergia, ictus, enfermedad de Alzheimer y / o enfermedades cardiovasculares isquémicas. La composición farmacéutica puede administrarse por diferentes vías. Por ejemplo, pueden administrarse por vía oral en forma de preparados farmacéuticos tales como comprimidos, cápsulas, jarabes y suspensiones. También, parenteralmente en forma de soluciones o emulsiones, etc. Puede 10 también administrarse por vía tópica en forma de cremas, pomadas, bálsamos, etc. y transdérmicamente por ejemplo, mediante el uso de parches o bandas. También pueden aplicarse directamente en el recto como supositorios. Estos preparados pueden contener excipientes, activadores, agentes quelantes, estabilizadores, etc. fisiológicamente aceptables. En el caso de las inyecciones, se pueden incorporar 15 tampones, agentes solubilizantes o isotónicos fisiológicamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden incluir además un agente trombolítico, preferiblemente un activador del plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, alteplasa o anistreplasa. También pueden 20 contener un agente anticoagulante, preferiblemente heparina, dicumarol, acenocumarol, enoxaparina o polisulfato de pentosán. Además, pueden contener adicionalmente un agente antitrombótico, preferiblemente aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, triflusal, polisulfato de pentosano o abciximab. También pueden contener 25 inmunoglobulina o un fragmento de ésta que tenga especificidad por la glicoproteína IIb/IIIa.

De forma alternativa, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden contener además un agente hipolipemiante preferiblemente simvastatina, lovastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, lifibrol, acifrán, acitemato o 30 glunicato. También pueden contener un agente antioxidante / secuestrador de radicales libres, preferentemente seleccionado de entre nicaravén, ranolazina, emoxipina, glutationa, edaravona, raxofelast, licopene, acetilcisteina, N-Acetyl-L-cisteina, N-acetilcisteina o carvedilol.

35 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento y/o prevención de la aterosclerosis, vasculopatía del

trasplante cardiaco, activación de plaquetas, trombosis, ictus, daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia-reperfusión y / o condiciones patológicas donde el estrés oxidativo desempeña un papel importante en su patogénesis (tales pero sin limitarse a éstas, la alergia, el ictus, la enfermedad de Alzheimer, las enfermedades

5 isquémicas cardiovasculares); y/o condiciones patológicas donde un déficit de NO desempeña un papel importante en su patogénesis. También pueden utilizarse para el tratamiento y/o prevención de disfunciones del sistema circulatorio, especialmente disfunciones cardiovasculares y coronarias.

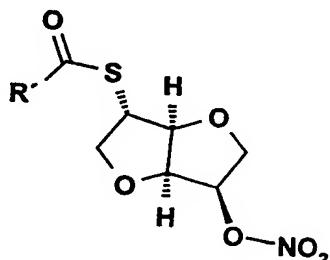
10 La dosis diaria puede variar en función de los síntomas específicos, la edad, el peso del paciente, el modo específico de administración, etc. y la dosis normal diaria para un adulto puede variar entre 0.1 y 500 mg. y puede administrarse en una dosis única o dividida en diferentes dosis a lo largo del día.

15 Otra incorporación de la presente invención tiene que ver con los procesos para preparar los compuestos de la fórmula I o sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico, tal y como se define anteriormente.

Por tanto, se proporciona un proceso que incluye los siguientes pasos:  
20

a) efectuar una hidrólisis de un compuesto de la fórmula II:

25



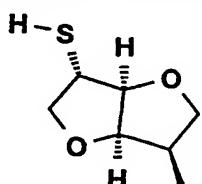
II

30

donde R' es C<sub>1-6</sub> alquilo, preferentemente metilo,

35

para obtener 2-tiosorbita 5-mononitrato (1),



(1)

y

b) opcionalmente, efectuar sobre el compuesto (1) preparado de acuerdo con el paso a):

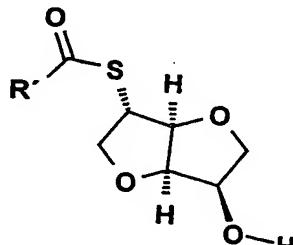
5

- I. Una oxidación para obtener 5,5'-dinitrato-2,2'-ditio-diisosorbida (2) o 2-(isosorbidil-2'-ditio)-isosorbida 5-mononitrato (8), o
- II. Una alquilación o arilación para obtener 2-(alquilo o arilo)tioisosorbida 5-mononitrato; opcionalmente seguido por una oxidación para obtener 2-(alquilo o arilo) sulfinil-isosorbida 5-mononitrato o 2-(alquilo o arilo)sulfonil-isosorbida 5-mononitrato, o
- III. Una nitrosación para obtener S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato (6).

10

15 15 Se proporciona otro proceso que incluye los siguientes pasos:  
a) efectuar una oxidación de un compuesto de la fórmula III:

20 (III)



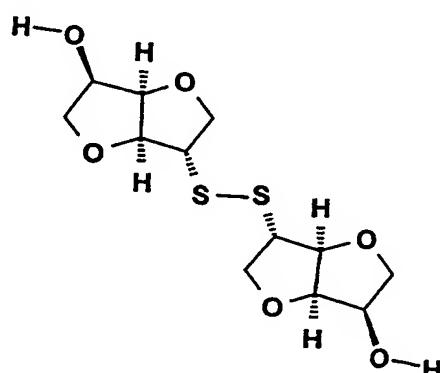
25

donde R' es C<sub>1-6</sub> alquilo, preferentemente metilo,

25

para obtener 2,2'-ditio-diisosorbida(10),

30



35

(10) y

b) efectuar una nitración con un agente nitrante en presencia de un anhídrido carboxílico, preferentemente anhídrido acético, del compuesto preparado en el paso a) para obtener 2-(5'-aciloxi-isosorbidil-2'-ditio)-isosorbida 5-mononitrato.

5

Finalmente, otra incorporación de la presente invención tiene que ver con el compuesto 2, 2'-ditio-diisosorbida (10), que es un compuesto intermedio en la preparación del compuesto 11 de la invención.

- 10 En los ejemplos de trabajo incluidos en el presente documento (*vide infra*) se describen con detalle los procesos adecuados para obtener varios de los compuestos de acuerdo con la fórmula general(I). A la vista de estos ejemplos, es de conocimiento general entre las personas con formación obtener los compuestos no exemplificados explícitamente a través de las modificaciones adecuadas de los ejemplos  
15 de trabajo. Resultará obvio para una persona con formación que estos ejemplos son meramente ilustrativos y no deben considerarse como una limitación de la invención.

#### Ejemplos

20

Los compuestos obtenidos en los ejemplos que aparecen a continuación se identifican mediante los datos de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de su protón (<sup>1</sup>H-NMR) y carbono-13 (<sup>13</sup>C-NMR).

- 25 Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados utilizando espectrómetros Varian Gemini-2000 o Varian Gemini-300.

La frecuencia de operación y el disolvente utilizado para registrar el espectro aparecen indicados en los espectros <sup>1</sup>H-NMR. La posición de las señales se indican 30 en δ (ppm) y la señal de los protones del disolvente se toma como referencia. Los valores de referencia fueron 7.24 ppm para el cloroformo deuterado y 2.49 ppm para dimetil sulfóxido deuterado. La señal obtenida para los protones de tetrametilsilano (TMS) se toma ocasionalmente como referencia interna, con 0 ppm como valor de referencia. El número de protones de cada señal se miden mediante 35 integración electrónica y el tipo de señal se indica entre paréntesis utilizando las siguientes abreviaturas: s (simple), d (doblete), t (triplete), dd (doblete de dobletes),

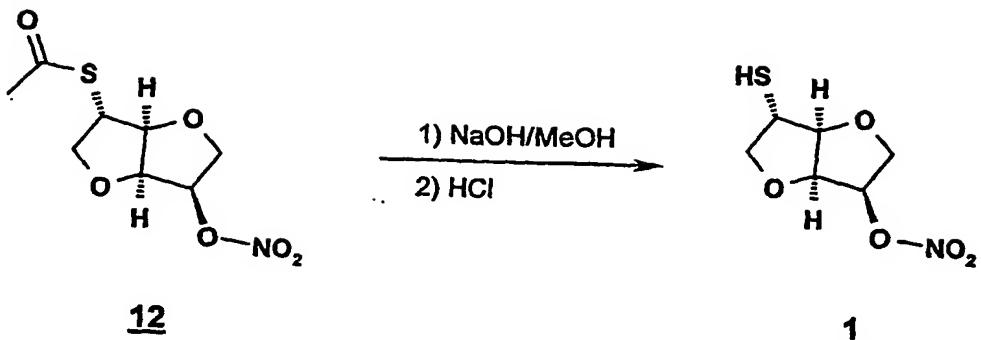
ddd (doblete de doblete de dobletes), bs (señal ancha), cs (señal compleja), s.a. D<sub>2</sub>O (simplifica traa deuterar), d.a. D<sub>2</sub>O (desaparece al deuterar).

- La frecuencia de operación y el disolvente utilizado para registrar el espectro
- 5 aparecen indicados en los espectros <sup>13</sup>C-NMR. La posición de las señales se indican en δ (ppm) y la señal de los carbonos del disolvente se toma como referencia. Los valores de referencia son 77.00 ppm para cloroformo deuterado y 39.50 ppm para dimetil sulfóxido hexadeuterado.
- 10 En algunos casos, también se llevaron a cabo experimentos de resonancia magnética nuclear utilizando las secuencias de pulso APT (Attached Proton Test), HETCOR (Heteronuclear Chemical Shift Correlation) o COSY (Correlated Spectroscopy) como ayuda para la asignación.
- 15 En la parte experimental, se emplean las siguientes abreviaturas:

	AcOEt	acetato de etilo
	AcOH	ácido acético
	DMSO-d <sub>6</sub>	dimetil sulfóxido hexadeuterado
20	EtOH	alcohol etílico
	EtOEt	éter dietílico
	HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
	Hx	hexano
	Mel	yoduro de metilo
25	MeOH	alcohol metílico
	THP	tetrahidropiranil

**EJEMPLO 1**

- 30 Método para la obtención de 2-tiososorbida 5-mononitrato (1).



En un matraz de 50 ml, se disuelve 1.00 g (4,02 mmol) de 2-acetiltiosorbid 5-mononitrato (12) obtenido de acuerdo con WO 00/20420 en 20,0 mL de alcohol metílico. Se añaden 10,0 mL de una solución de metanol al 10% de hidróxido de sodio de una vez. Después de tapar el matraz rápidamente se agita durante 1 minuto a temperatura ambiente (ca. 25°C). Se añaden de una vez 2,23 mL de ácido hidroclórico concentrado. Se agita y concentra hasta sequedad, eliminando el disolvente a presión reducida a una temperatura por debajo de los 30°C.

10

El residuo se suspende en cloroformo. Esta solución de cloroformo se filtra y posteriormente seca sobre sulfato de magnesio anhidro. Tras la filtración, se elimina el disolvente a presión reducida. Se seca a presión reducida para obtener 0,83 g de un aceite anaranjado-amarillento correspondiente al producto que nos ocupa. Rendimiento: 100%.

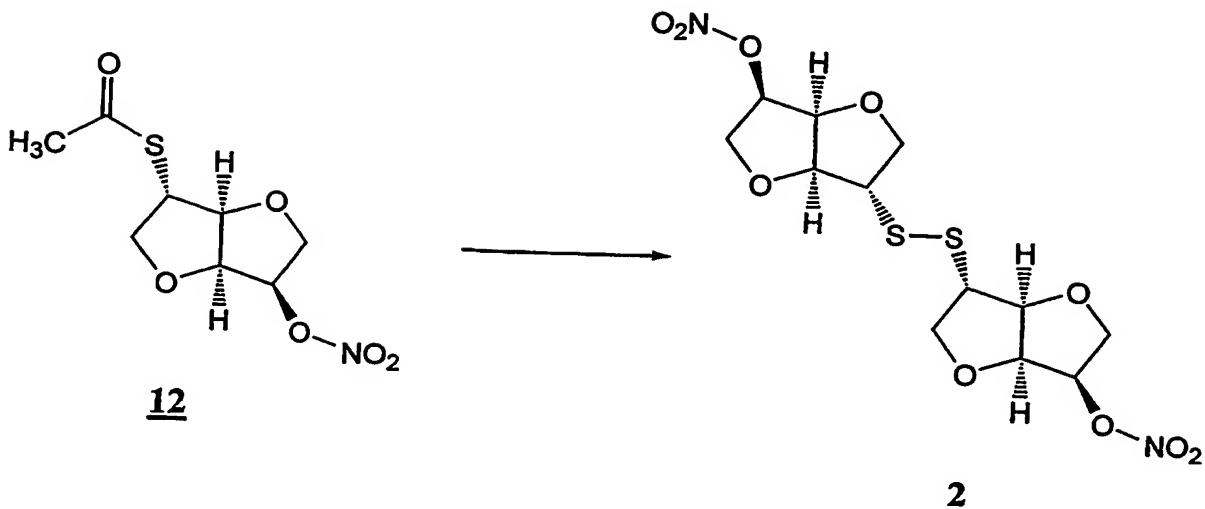
15  
20  
<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,36-5,26 (1H, m, CHONO<sub>2</sub>), 4,95 (1H, t, J=5,0 Hz, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,42 (1H, d, 4,8 Hz, CHCHS), 4,07 (1H, dd, J=4,6 Hz, J=4,4 Hz, H-CHCHS), 3,97 (1H, dd, J=5,64 Hz, J=2,5 Hz, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 3,87-3,76 (2H, cs, H-CHCHS, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 3,45-3,35 (1H, m, CHS), 1,77 (1H, d, J=8,6Hz, SH).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 91,21 (CHCHS), 81,22 (CHONO<sub>2</sub>), 81,07 (CHCHONO<sub>2</sub>), 76,15 (CH<sub>2</sub>CHS), 69,26 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 42,82 (CHS).

25

#### EJEMPLO 2

Método para la obtención de 5,5'-dinitrato-2,2'-ditio-diisorbid (2)



**Procedimiento 1:**

5

Se disuelven 0,50 g de 2-acetiltiososorbida 5-mononitrato (**12**) obtenidos de acuerdo con WO 00/20420 en 10,0 mL de alcohol metílico. Esta solución se añade lentamente, gota a gota, a 200,0 mL de plasma humano en un matraz de 250 mL con agitación magnética intensa. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 15 horas. El crudo de reacción se vierte sobre 500,0 mL de acetonitrilo mientras se agita vigorosamente, se observa la precipitación instantánea de un sólido blanco floculante correspondiente a las proteínas del plasma. Se centrifuga a 3000 rpm y a 20 °C durante 30 min y se separa el líquido y el sólido (masa proteica). Se resuspende el sólido en 250,0 mL de acetonitrilo. Se agita y centrifuga bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente (3000 rpm/20°C/30 min).

10

15

Se decanta y se combina el líquido sobrenadante con el anterior. El disolvente se evapora a presión reducida a una temperatura por debajo de los 30°C. El residuo

20

acuoso resultante (alrededor de 200,0 mL), se extrae con cloroformo 4 x 500,0 mL. Las fases orgánicas se combinan y secan sobre sulfato de magnesio anhídrido.

Se filtra y se concentra el disolvente a presión reducida. Se obtienen 350 mg de un sólido blanco que se purifica mediante cromatografía: ( $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$  6:1), aislándose 250 mg de un sólido blanco correspondiente al producto de disulfuro 2-

25

tiososorbida 5-mononitrato (**2**). Rendimiento: 60%.

**Procedimiento 2:**

En un matraz de 50,0 mL, se disuelve 1,00 g (4,02 mmol) de 2-acetiltioisosorbida 5-mononitrato (12) obtenido de acuerdo con WO 00/20420 en 20,0 mL de alcohol

- 5 metílico y se añaden 10,0 mL de una solución de metanol al 10% de hidróxido de potasio. Se tapa el matraz y se agita la mezcla de reacción durante 5 horas a temperatura ambiente. Se observa la precipitación de un sólido blanco correspondiente al disulfuro (2) durante la reacción. El sólido se filtra y lava varias veces con alcohol metílico. Mediante el secado a presión reducida, se obtienen  
10 0,58 g de un sólido blanco correspondiente al producto disulfuro 2-tiososorbida 5-mononitrato (2). Rendimiento: 70%.

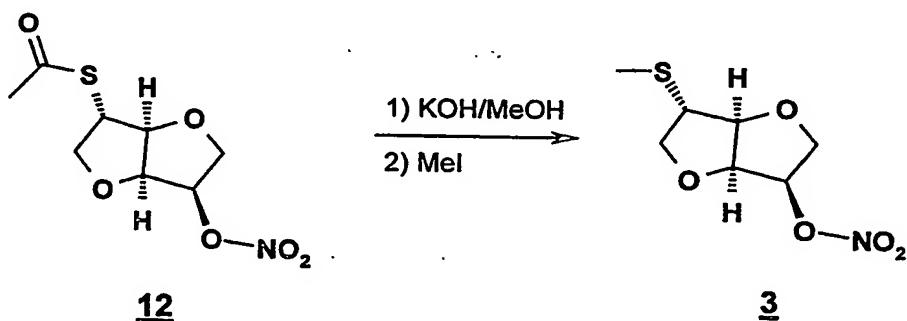
<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 5,51-5,43 (2H, m, 2CHONO<sub>2</sub>), 4,96 (2H, t, J=5,4 Hz, 2CHCHONO<sub>2</sub>), 4,51 (2H, d, J=4,8 Hz, 2CHCHS), 4,04-3,73 (10H, cs, 15 2CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>, 2CH<sub>2</sub>CHS, 2CHS).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 88,46 (2CHCHS), 83,31 (2CHONO<sub>2</sub>), 81,50 (2CHCHONO<sub>2</sub>), 73,24 (2 CH<sub>2</sub>CHS), 69,95 (2CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 54,01 (2CHS).

20

**EJEMPLO 3**

Método para la obtención de 2-metiltioisosorbida 5-mononitrato (3).



- 25 En un matraz de 50 mL, se disuelve 1,00 g (4,02 mmol) de 2-acetiltioisosorbida 5-mononitrato (12) obtenido de acuerdo con WO 00/20420 en 20,0 mL de alcohol metílico y se añaden de una vez 5,0 mL de una solución de metanol al 10% de

hidróxido de potasio. Se tapa el matraz y la mezcla de reacción se agita durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añaden 2,0 mL de yoduro de metilo (32,00 mmol) de una vez, se tapa el matraz y agita la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente.

- 5 Se concentra hasta sequedad, eliminando el disolvente a presión reducida. El residuo se disuelve en 250,0 mL de cloroformo y se lava con 50,0 mL de agua. La fase orgánica se separa y se lava con 3 x 50,0 mL de agua.

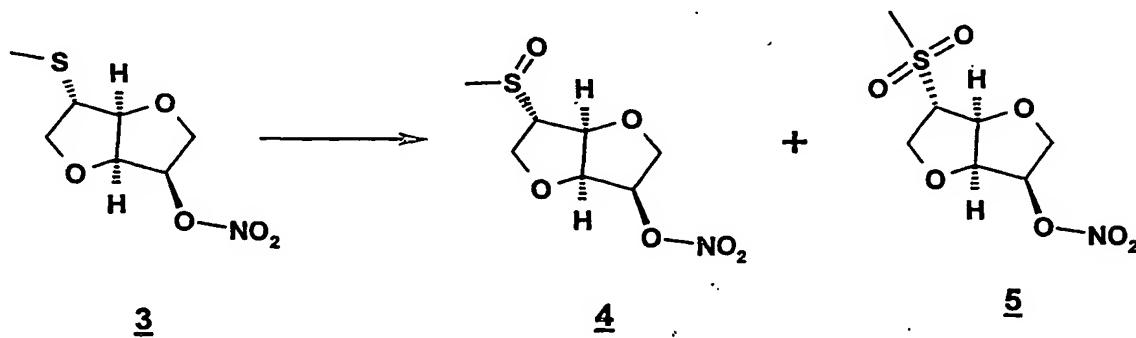
- 10 Se seca sobre sulfato de magnesio anhídrido, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. Tras el secado a presión reducida, se obtienen 0,68 g de un sólido blanco correspondiente al producto de interés. Rendimiento: 76%.

- 15 <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,34-5,26 (1H, m, CHONO<sub>2</sub>), 4,93 (1H, t, J=5,2 Hz, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,48 (1H, d, J=4,8Hz, CHCHS), 4,14 (1H, dd, J=9,7 Hz, J=4,8 Hz, H-CHCHS), 4,01 (1H, dd, J=11,2 Hz, J=3,0 Hz, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 4,01-3,81 (2H, cs, H-CHCHS, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 3,30-3,24 (1H, m, CHS), 2,15 (3H; s, CH<sub>3</sub>).

- 20 <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 88,65 (CHCHS), 81,55 (CHCHONO<sub>2</sub>), 81,26 (CHONO<sub>2</sub>), 73,87 (CH<sub>2</sub>CHS), 69,10 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>) 50,74 (CHS), 14,74 (CH<sub>3</sub>).

#### EJEMPLO 4

- 25 Método para la obtención de 2-metilsulfinilisosorbida 5-mononitrato (4) y 2-metilsulfonilisosorbida 5-mononitrato (5)

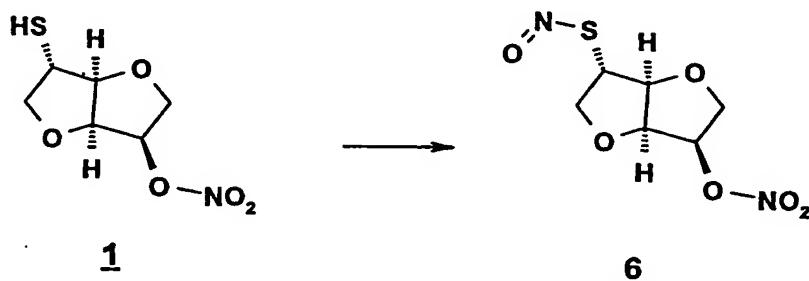


- En un matraz de 500 mL, se disuelven 7,3 g (32,9 mmol) de 2-metiltiosorбida 5-mononitrato (3) obtenidos de acuerdo con el ejemplo 3 en 75 mL de dioxano. Se añade muy lentamente una soluci髇 de 7,04 g (32,9 mmol) de NaIO<sub>4</sub> en 110 mL de agua, gota a gota, y después se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. Se filtra la mezcla y se elimina el dioxano a presión reducida. Se añaden 150 mL de agua. La mezcla se extrae con 2 x 300 mL porciones de cloroformo. Se seca sobre sulfato de magnesio anh ido, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. Se obtienen 6,6 g de un crudo de reacción que contiene un 65% de (4) y un 35% de (5). El crudo de reacción resultante se recristaliza dos veces con 1 dioxano para obtener 2,9 g del producto de interés (4) con una pureza del 95% mediante HPLC. Se elimina a presión reducida el disolvente de las aguas madres de la primera recristalización y se recristaliza el residuo resultante con dioxano para obtener 1 g del producto de interés (5) con una pureza del 95% mediante HPLC.
- 15 **2-Metilsulfinilisorбida 5-mononitrato (4):**
- <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,39-5,28 (1H, m, CHONO<sub>2</sub>), 5,02 (1H, dd, J=5,6 Hz, J=1,6 Hz, CHCHS), 4,89 (1H, t, J=5,5 Hz, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,29 (1H, dd, J=10,4 Hz, J=6,4 Hz, H-CHCHS), 4,20-3,91 (3H, cs, H-CHCHS, CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 3,38-3,31 (1H, m, CHSO), 2,61 (3H, s, CH<sub>3</sub>).
- 20 <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 82,11 (CHCHONO<sub>2</sub>), 81,51 (CHCHS), 80,55 (CHONO<sub>2</sub>), 69,65 (CH<sub>2</sub>CHS) 69,28 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 66,24 (CHSO), 37,28 (CH<sub>3</sub>).
- 25 **2-Metilsulfonilisorбida 5-mononitrato (5):**
- <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,39-5,28 (1H, m, CHONO<sub>2</sub>), 4,89 (1H, t, J=5,6 Hz, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,68 (1H, d, 5,4 Hz, CHCHS), 4,40-3,88 (4H, cs, CH<sub>2</sub>CHS, CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 3,48-3,40 (1H, m, CHSO<sub>2</sub>), 2,58 (3H, s, CH<sub>3</sub>).
- 30 <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 82,92 (CHCHS), 82,30 (CHCHONO<sub>2</sub>), 80,54 (CHONO<sub>2</sub>), 69,22 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 67,92 (CH<sub>2</sub>CHS), 66,98 (CHSO<sub>2</sub>), 36,68 (CH<sub>3</sub>).

**EJEMPLO 5**

**Método para la obtención de S-nitroso-2-tiosorbita 5-mononitrato (6)**

5



En un vial de color ámbar, se disuelven 0,5 g (2,41 mmol) de 2-tiosorbita 5-mononitrato (1), obtenidos de acuerdo con el ejemplo 1, en 4,0 mL de MeOH, se tapa el vial y se agita en un baño de hielo. Se añaden 320  $\mu$ L (0,249 g, 2,41 mmol)

10 de tert-butoxitriptófano y se agita con el vial tapado bajo condiciones de frío durante 7 horas. El sólido blanco se filtra y el filtrado se concentra hasta sequedad a presión reducida, temperatura ambiente y protegido de la luz. Se obtienen 0,48 g (rendimiento: 84%) de un sólido rojo intenso identificado como S-nitroso-2-tiosorbita 5-mononitrato (6).

15

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz): 5,40-5,25 (sc, 1H, CHONO<sub>2</sub>), 4,84-4,64 (sc, 2H, CHSNO, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,40-4,30 (m, 2H, H-CHCHSNO, CHCHSNO), 4,12 (dd, 1H, J=11,4 Hz, J=2,6 Hz, H-CHCHONO<sub>2</sub>), 4,00-3,80 (sc, 2H, H-CHCHSNO, H-CHCHONO<sub>2</sub>).

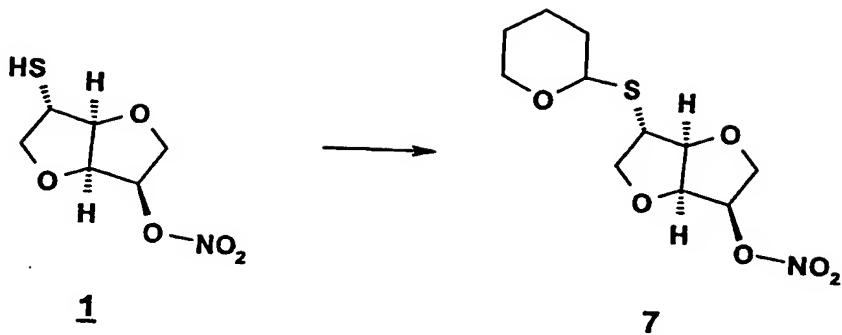
20

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz): 88,2 (CHCHSNO), 81,9+81,1 (CHCHONO<sub>2</sub>, CHONO<sub>2</sub>), 73,4 (CH<sub>2</sub>CHSNO), 69,5 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 51,6 (CHSNO).

25

**EJEMPLO 6**

**Método para la obtención de 2-(tetrahidropiran-2-il-tio)isosorbita 5-mononitrato (7)**



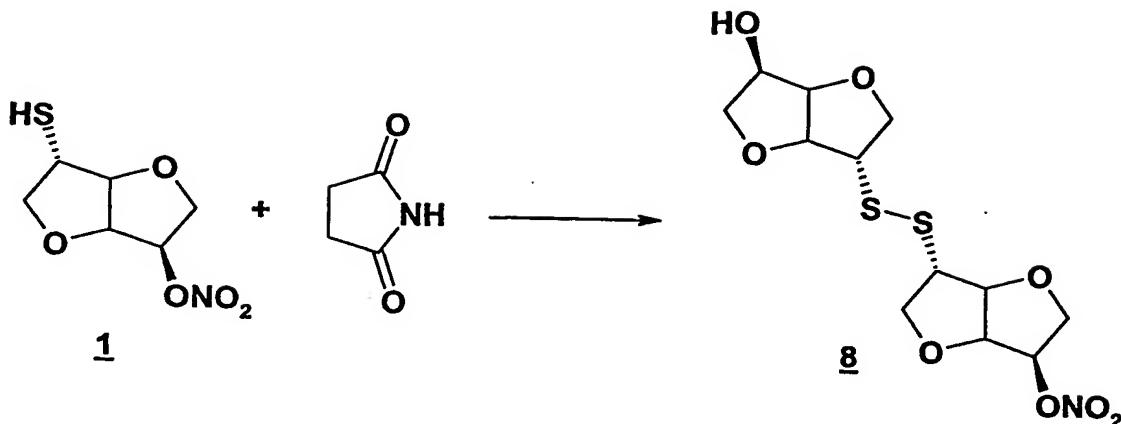
Se suspenden 0,5 g (2,41 mmol) de 2-tioisosorbida 5-mononitrato (**1**), obtenidos de acuerdo con el ejemplo 1, en 6 mL de 3,4-dihidro-2H-piran y se enfria la mezcla en un baño de hielo. Se añaden 0,10 g (0,40 mmol) de p-toluenesulfonato de piridinio y se agita a temperatura ambiente durante una noche bajo atmósfera de nitrógeno. Se añaden 50 mL de EtOEt y la mezcla se lava con 2 x 40 mL de una solución saturada de NaCl. Se obtienen 1,15 g de un crudo de reacción que se purifica por cromatografía (Hx:AcOEt 3:2) rindiendo 0,65 g del producto de interés con una pureza del 83%. La recristalización con hexano rinde 0,45 g del producto con una pureza del 95%, identificado por sus datos espectroscópicos como 2-(tetrahidropiran-2-il)-2-tioisosorbida 5-mononitrato (**7**).

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):** 5,28 (ddd, 1H, J=11,0Hz, 5,4Hz, 2,8Hz, CHONO<sub>2</sub>), 5,0-4,85 (sc, 2H, CHSTHP, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,59 (dd, 1H, J=11,2Hz, 4,6Hz, CHCHSTHP), 4,20-3,80 (sc, 5H, CH<sub>2</sub>CHSTHP, H-CHCHONO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub> THP), 3,60-3,40 (sc, 2H, H-CHCHONO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub> THP), 2,00-1,45 (sc, 6H, 3CH<sub>2</sub> THP).

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz):** 89,5 and 89,1 (CHCHS), 83,0 and 81,6 (CHCHONO<sub>2</sub>), 81,4 and 81,3 (CHSTHP, CHONO<sub>2</sub>), 74,9 and 74,1 (CH<sub>2</sub> THP), 69,0 and 68,9 (CH<sub>2</sub>CHSTHP), 64,8 and 64,7 (CH<sub>2</sub>CHONO<sub>2</sub>), 49,1 and 47,6 (CH<sub>2</sub> THP), 31,3 and 31,2 (CH<sub>2</sub> THP), 25,4 (CH<sub>2</sub> THP), 21,7 and 21,6 (CH<sub>2</sub> THP).

#### EJEMPLO 7

**25 Método para la obtención de 2-(isosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato (8)**



A una solución de 0,170 g (1,72 mmol) de succinimida en EtOH se añade a 0,323 g (1,56 mmol) de 2-tioisosorbida 5-mononitrato (**1**). Tras la aparición de un precipitado

5 blanco, se añaden 0,168 mg (2 mmol) de NaHCO<sub>3</sub>. Tras agitar a temperatura ambiente durante 3 horas y 45 minutos, se añaden otros 100 mg (1,19 mmol) de NaHCO<sub>3</sub> y 10 gotas de agua. Tras otra hora y 30 minutos de agitación, se lleva la mezcla a reflujo. Tras dos horas a reflujo, se elimina el EtOH a presión reducida y se añaden 150 mL de agua y 150 mL de AcOEt. Se forma una emulsión y se añade 10 NaCl<sub>(s)</sub> hasta que las dos fases decantan. La fase orgánica se separa y la fase acuosa se lava con 2 x 150 mL porciones de AcOEt. Las tres fases orgánicas se lavan por separado con 100 mL de agua para cada una y las fases orgánicas se combinan y secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Se filtra, se lava con AcOEt y se elimina el disolvente de la filtración a presión reducida, obteniéndose así 336 mg de un 15 crudo de reacción que se purifica por cromatografía flash. Se usa una mezcla de 1:1 CHCl<sub>3</sub>/AcOEt como eluyente para la separación cromatográfica y se obtiene una fracción de 98 mg del producto de interés (**8**).

20 <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,40-5,32 (1H, cs, CHONO<sub>2</sub>), 5,04-4,98 (1H, cs, CHCHONO<sub>2</sub>), 4,70-4,60 (3H, cs, 3CH), 4,36-4,26 (1H, cs, CHOH), 4,22-4,12 (2H, cs, 2H-CH), 4,10-4,00 (3H, cs, 3H-CH), 3,94-3,86 (2H, cs, 2H-CH), 3,68-3,56 (3H, cs, 2CH-S, 1 H-CH), 2,55 (1H, d, J=6,9 Hz, OH).

25 Espectroscopia infrarroja (en pastilla KBr): 3461 cm<sup>-1</sup>, 2987 cm<sup>-1</sup>, 1642 cm<sup>-1</sup>, 1465 cm<sup>-1</sup>, 1279 cm<sup>-1</sup>, 1077 cm<sup>-1</sup>, 846 cm<sup>-1</sup>.

Microanálisis:

experimental (%): 39,53 C, 34,70 H, 4,77 O, 3,96 N, 17,04 S.  
calculado(%): 39,23 C, 34,84 H, 4,66 O, 3,81 N, 17,45 S.

**Espectrometría de masas:**

5 Electrospray: 368(M+1).

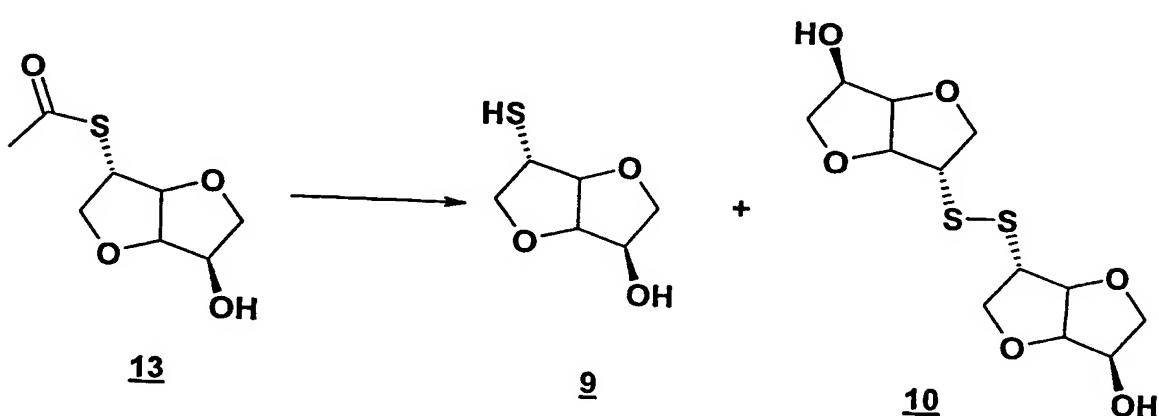
Impacto electrónico (m/z, (% abundancia relativa)): 367 (7,4)(M+), 261 (3,8), 160 (8,6), 129 (15,5), 127(14,2), 85 (35,7), 69 (100).

10 **EJEMPLO 8**

**Paso 1**

**Método para la obtención de 2-tiosorbita (9) y 2,2'-ditiodiisosorbida (10)**

15



En un matraz de 500 mL, se disuelven 15 g (74 mmol) de 2-acetiltiosorbita (13), obtenidos de acuerdo con WO 00/20420, en 225 mL de EtOH. Se añade una

20 disolución de 11,3 g de KOH del 85 % en 150 mL de agua. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas, se neutraliza con AcOH<sub>(c)</sub> y se elimina el EtOH a presión reducida. La solución resultante se lleva a pH básico mediante la adición de NaOH<sub>(s)</sub> y se agita a temperatura ambiente mientras que se burbujea una corriente de aire a través de la solución durante 10 horas. Se acidifica 25 la solución con HCl<sub>(c)</sub> y se lleva a pH=4. Se elimina el agua a presión reducida y el residuo resultante se vuelve a disolver en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtrado y secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Se filtra, se lava la solución y se elimina el disolvente de la filtración a presión reducida, obteniéndose así 9,22 g de un crudo de reacción que se purifica

mediante cromatografía flash utilizando diferentes mezclas de ciclohexano/acetato de etilo como eluyente. La elución se inicia con 3 L de mezcla 1:1 y, después de ello, el porcentaje del disolvente polar aumenta, primero con 2 L de mezcla 3:5, posteriormente con 2 L de mezcla 1:2 y finalmente se eluye únicamente con AcOEt.

- 5 Se aíslan 2,64 g del tiol (9) y otros 3,06 g de disulfuro (10).

### 2-Tiososorbida (9)

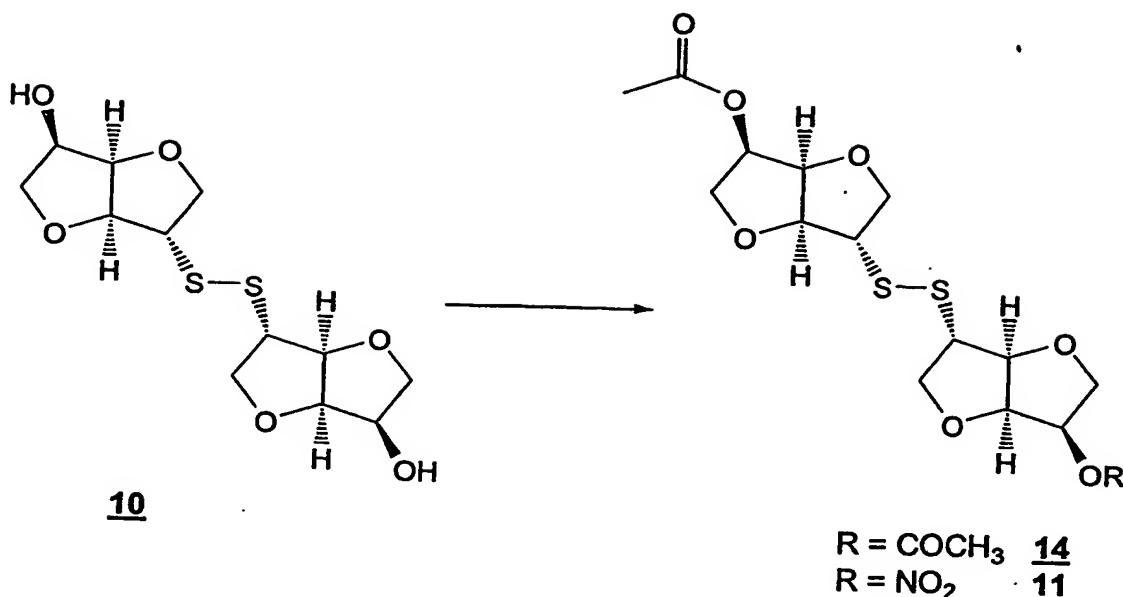
- 10 <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4,68-4,58 (1H, cs, CHCHOH), 4,48-4,40 (1H, cs, CHCHSH), 4,34-4,18 (1H, bs, s.a. D<sub>2</sub>O, CHOH), 4,16-4,06 (1H, m H-CHCHSH), 3,96-3,78 (2H, cs, H-CHCHOH, H-CHCHSH), 3,62-3,50 (1H, cs, 1 H-CHCHOH), 3,48-3,36 (1H, cs, s.a. D<sub>2</sub>O, CHS), 2,80-2,60 (1H, bs, d.a. D<sub>2</sub>O, OH), 1,75 (1H, d, J=8 Hz, d.a. D<sub>2</sub>O, SH).
- 15 <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 90,42 (CHCHSH), 81,47 (CHCHOH), 76,27 (CH<sub>2</sub>CHSH), 74,00 (CH<sub>2</sub>CHOH), 72,04 (CHOH), 43,81 (CHSH).

### 2,2'-Ditio-diisosorbida (10)

- 20 <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4,68-4,56 (4H, cs, 2CHCHS, 2CHCHOH), 4,34-4,19 (2H, cs, s.a. D<sub>2</sub>O, 2 CHOH), 4,19-3,97 (4H, cs, 2CH<sub>2</sub>CHS), 3,92-3,80 (2H, cs, 2H-CHCHOH), 3,66-3,52 (4H, cs, 2H-CHCHOH, 2CHS), 2,63 (2H, d, J=6,6 Hz, d.a. D<sub>2</sub>O, 2OH).
- 25 <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 87,42 (2CHCHS), 81,98 (2CHCHOH), 73,93 (2CH<sub>2</sub>CHOH) 72,89 (2CH<sub>2</sub>CHS), 72,07 (2CHOH), 54,74 (2CHS).

### Paso 2

- 30 Método para la obtención de 5,5'-diacetiloxi-2,2'-ditiodiisosorbida (14) y 2-(5'-acetiloxiisosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato (11)



- Se prepara una mezcla de nitración mediante la adición, lenta y cuidadosa, de 1,8 mL de 60% de HNO<sub>3</sub>, a 0 °C, a una mezcla de 7,5 mL de anhídrido acético y 12,5 mL de ácido acético. En un matraz de 100 mL con un refrigerante de reflujo, termómetro y un agitador magnético se disuelven 2,77 g (8,6 mmol) de 2,2'-ditiodiisosorbida (**10**), obtenidos de acuerdo con el ejemplo 8, en 17 mL de ácido acético y se añaden 3,5 mL de anhídrido acético. Se enfriá la mezcla a una temperatura de 0°C en un baño de hielo y sal. A los 15 minutos, se añaden 4 mL de la mezcla de nitración previamente preparada, gota a gota. Se agita a 0 °C durante 2 horas, observando la solidificación del crudo de reacción. Posteriormente, se agita durante 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente. El crudo de reacción se vierte sobre 100 mL de agua, se filtra y se lava con muchá cantidad de agua. El sólido resultante se seca a presión reducida en presencia de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Se obtienen 2,69 g de un crudo de reacción que se purifica mediante cromatografía preparativa de fase reversa. Se utiliza como eluyente una mezcla 1:1 acetonitrilo:agua. Se aísla una fracción de 1,01 g del diacetato (**14**)(R=COCH<sub>3</sub>) y otra fracción de 0,5 g de acetato-nitrato (**11**)(R=NO<sub>2</sub>).
- 20 **5,5'-diacetiloxy-2,2'-ditiodiisosorbida (R=COCH<sub>3</sub>) (14)**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,16-5,02 (2H, cs, 2CHOCO), 4,85-4,76 (2H, cs, 2CH-O-C), 4,63-4,56 (2H, cs, 2CHOC), 4,17-4,05 (2H, cs, 2H-CH), 4,00-3,74 (6H, cs, 6 H-CH), 3,56-3,48 (2H, cs, 2CHS), 2,09 (6H, s, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,27 (2CO), 87,73 (2CHCHS), 80,76 (2CHCHO), 73,79 (2CHO), 72,66 (2CH<sub>2</sub>CHS), 70,46 (2CH<sub>2</sub>CHO), 54,42 (2CHS), 20,63 (2CH<sub>3</sub>).

5    **2-(5'-Acetiloxyisosorbidil-2'-ditio)isosorbida 5-mononitrato (R=NO<sub>2</sub>) (11)**

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,37-5,28 (1H, cs, CHONO<sub>2</sub>), 5,18-5,06 (1H, cs, CHO-CO), 5,02-4,94 (1H, cs, CHOC), 4,87-4,78 (1H, cs, CHOC), 4,64-4,56 (2H, cs, 2CHOC), 4,18-3,75 (8H, cs, 4CH<sub>2</sub>), 3,59-3,50 (2H, cs, 2 CHS), 2,10 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

10

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,29 (CO), 88,25 (CH), 87,43 (CH), 81,58 (CH), 81,16 (CH), 80,79 (CH), 73,80 (CH), 72,78 (CH<sub>2</sub>), 72,66 (CH<sub>2</sub>), 70,51 (CH<sub>2</sub>), 69,32 (CH<sub>2</sub>), 54,42 (CHS), 53,72 (CHS), 20,65 (CH<sub>3</sub>).

15    **Espectrometría de masas:**

Ionización química (NH<sub>3</sub>): 410 (M+1)<sup>+</sup>, 427 (M+18)<sup>+</sup>.

20    **Ensayos para vasorelajación**

El método utilizado en los ensayos es sustancialmente el mismo que el descrito en las siguientes referencias:

25    \* Furchtgott, R.F., "Methods in nitric oxide research"; Feilisch & Stamler, eds., John Wiley & Sons, Chichester, England, pp 567-581.

\* Trongvanbichnam K., et al., Jpn. J. Pharmacol. 71 (1996); 167-173.

\* Salas, E., et al., Eur. J. Pharmacol. 258 (1994); 47-55.

30    Los diferentes compuestos se someten a ensayo a 5 concentraciones diferentes, con un rango de concentración que oscila entre 0.0001 y 10 mM, utilizando entre 6 y 9 anillos arteriales para cada compuesto. Los resultados obtenidos se comparan con los del isosorbida 5-mononitrato, que se utiliza como producto de referencia.

35    Los resultados se muestran en la tabla 1 y se expresan como EC<sub>50</sub> (concentración efectiva 50), que es la concentración de cada uno de los compuesto sometido a

ensayo que produce una vasodilatación igual al 50% del tono máximo al que el anillo arterial se ha contraído con 1  $\mu\text{M}$  de Fenilefrina .

Tabla 1.- Ensayo de vasorelajación

Compuesto	EC <sub>50</sub> mM (media $\pm$ SD)
Isosorbida 5-mononitrato	0.92 $\pm$ 0.2
(1)	0.041 $\pm$ 0.006
(2)	0.0053 $\pm$ 0.001
(3)	0.043 $\pm$ 0.006
(4)	0.338 $\pm$ 0.01
(6)	0.0012 $\pm$ 0.0001
(7)	0.05 $\pm$ 0.009
(9)	0.024 $\pm$ 0.005
(12)	0.023 $\pm$ 0.010

5

Como puede observarse en la tabla, todos los compuestos sometidos a ensayo son más potentes como vasorelajantes que el producto de referencia.

10

El método empleado en los ensayos es sustancialmente el mismo que el descrito en la siguiente referencia:

15

\* Salas, E., et al., Br. J. Pharmacol. 112 (1994); 1071-1076.

20

Los compuestos se someten a ensayo a cuatro concentraciones diferentes utilizando plasma humano rico en plaquetas obtenido de por lo menos 6 donantes sanos diferentes. Los resultados obtenidos se comparan con los de 5-isosorbida mononitrato, que se utiliza como producto de referencia.

Los resultados se muestran en la tabla 2 y se expresan como IC<sub>50</sub> (concentración inhibidora 50), que es la concentración de cada compuesto sometido a ensayo que producen una inhibición igual al 50% de la agregación obtenida mediante una

concentración submáxima (1-4  $\mu\text{M}$ ) de ADP (una concentración submáxima de ADP es la cantidad mínima de ADP que produce la agregación máxima).

Tabla 2.- Ensayo de inhibición de la agregación de las plaquetas (Plasma humano rico en plaquetas)

Compuesto	IC <sub>50</sub> mM (media $\pm$ SD)
Isosorbida 5-mononitrato	2.68 $\pm$ 0.33
(1)	0.11 $\pm$ 0.01
(2)	0.01 $\pm$ 0.007
(3)	0.41 $\pm$ 0.09
(4)	1.00 $\pm$ 0.01
(5)	0.85 $\pm$ 0.15
(6)	0.0019 $\pm$ 0.0005
(7)	0.58 $\pm$ 0.021
(12)	0.089 $\pm$ 0.01

- 5 Como puede observarse en la tabla 2, todos los compuestos sometidos a ensayo tienen una potente actividad inhibidora de la agregación de plaquetas, actividad que resulta superior a la del compuesto de referencia.

**Inhibición de adhesión de monocito humano y plaquetas a células endoteliales humanas**

10

Los métodos utilizados en los ensayos para determinar el efecto de los compuestos sobre la adhesión de plaquetas y monocito a células endoteliales humanas son sustancialmente iguales a los descritos en las siguientes referencias:

- 15 Del Maschio A. et al., J Cell Biol 1996 ; 135 : 497-510  
Bombeli T. et al., Blood 1999; 93 : 3831-3838  
Colomé C. et al; Atherosclerosis 2000; 149: 295-302; and  
Martin-Satue M. et al; British Journal of Cancer 1999; 80; 1169-1174
- 20 La adhesión de células monocíticas U937 a células endoteliales confluentes de la microvasculatura humana (HMEC-1) activadas mediante TNF- $\alpha$  ( 50 ng/ml) y de las plaquetas a células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC)activadas mediante LDL minimamente modificada /50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) fue los métodos utilizados para

determinar el efecto inhibidor de los compuestos sobre la adhesión celular. La adhesión de los monocitos previamente marcados con calcein-AM (Molecular Probes) a HMEC-1 activado mediante TNF- $\alpha$ , fue evaluada mediante la determinación de la fluorescencia celular asociada. La adhesión de plaquetas humanas lavadas previamente marcadas con MoAb contra CD36-FITC a HUVEC activado (50  $\mu$ g/ml de LDL mínimamente modificado, LDLmm) fue determinada mediante Citometría de Escaneado Láser (LSC, Olimpus), determinando la fluorescencia celular asociada. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición con respecto del control (adhesión de las células en ausencia de compuestos). La tabla 3 muestra el efecto de los compuestos sobre la adhesión U947 a HMEC-1 activado. La tabla 4 muestra el efecto de los compuestos sobre la adhesión de plaquetas a HUVEC activado.

Tabla 3

Inhibición de adhesión de monocito U937 a células endoteliales humanas activadas HMEC-1	
Compuesto	% de inhibición a control (media $\pm$ s.e.m.)
(1)	30 $\pm$ 8
(12)	15 $\pm$ 2

15

Tabla 4

Inhibición de adhesión de plaquetas a HUVEC activado mediante LDLmm (50 $\mu$ g/ml)	
Compuesto	% de inhibición a control (media $\pm$ s.e.m.)
(12)	87,5% $\pm$ 5,1%

20

#### Inhibición de transcitosis de LDL en células endoteliales microvasculares humanas

El método utilizado en los ensayos para determinar el efecto de los compuestos en la transcitosis de LDL en células endoteliales microvasculares humanas es sustancialmente el mismo que el descrito en Colomé C. et al; Atherosclerosis 2000;

149: 295-302. Este ensayo permite predecir el potencial antiaterosclerótico de los compuestos, ya que la acumulación de LDL en la pared vascular como consecuencia del transporte activo de una célula endotelial vascular es uno de los primeros pasos en el desarrollo de la aterosclerosis.

5

El método empleado en los ensayos para aislar las partículas de LDL a partir de plasma humano fresco y el marcaje con Dil es sustancialmente igual al descrito en Pedreño J. et al., Atherosclerosis 2001; 155: 99-112, y Stephan Z.F. y Yuracheck E.C. J. Lipid Res. 1993; 34:325-330

10

HMEC-1 activadas (100  $\mu$ M histamina) y no activadas fueron cultivadas hasta confluencia en el pocillo superior de insertos de cocultivo (Falcon HTS FluorBloK). Posteriormente, se añadió LDL-Dil (hasta 200  $\mu$ g/ml) y se incubaron las células durante 2 h en presencia y ausencia de los compuestos. Tras esas dos horas, se evaluó la transcitosis de partículas LDL-Dil a través de células endoteliales mediante la determinación de la presencia de fluorescencia en el pocillo inferior del inserto de cocultivo. Los resultados se expresan en forma de porcentaje de inhibición con respecto del control (en ausencia de compuestos). La tabla 5 muestra el efecto de los compuestos en la transcitosis LDL-Dil a través de HMEC-1.

15  
20 Tabla 5

Inhibición de transcitosis LDL en células endoteliales microvasculares humanas		
	% de inhibición a control (media $\pm$ s.e.m.)	
	Células en reposo	Células estimuladas
Compuesto		
(1)	58 $\pm$ 15	122 $\pm$ 8
(12)	51 $\pm$ 19	80 $\pm$ 12

#### Inhibición de oxidación LDL

25

El método utilizado en los ensayos para determinar el efecto de los compuestos sobre la oxidación LDL es sustancialmente el mismo que el descrito en las siguientes referencias:

Spranger T., et al., Chem. Phys. Lipids 1998 ; 91 :39-52

Lynch S.M., et al., Biochim. Biophys. Acta 2000; 1485:11-22  
Pedreño J., et al., Thromb. Res. 2000; 99: 51-60.

- El método utilizado en los ensayos para aislar las partículas LDL del plasma humano fresco es sustancialmente igual al descrito en Pedreño J., et al., Atherosclerosis 2001; 155: 99-112.
- 5 La modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es considerada actualmente como el acontecimiento central del desarrollo de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. La exposición de LDL a hemina libre de globina (el complejo de ión férrico ( $Fe^{3+}$ ) con protoporfirina IX), derivada de la hemoglobina de los eritrocitos circulantes sirve de fuente fisiológica del prooxidante  $Fe^{3+}$  capaz de promover la oxidación de LDL. Los compuestos se añaden in vitro para determinar su actividad inhibidora en la oxidación LDL inducida por la hemina y  $H_2O_2$ . Se incubó LDL a una concentración final de proteína de 0,2 mg/ml en presencia de 2,5  $\mu M$  de hemina y 5  $\mu M$   $H_2O_2$ . La modificación oxidativa de las partículas LDL fue evaluada mediante la medición de los dienos conjugados. Las muestras experimentales fueron incubadas a 37°C y el aumento de la absorbancia a 234 nm fue registrado automáticamente cada 5 min durante al menos 5 h. El efecto de los compuestos sobre la oxidación LDL inducida por la hemina fue sometido a ensayo a 7 concentraciones diferentes utilizando preparados de LDL de 7 donantes sanos diferentes. La tabla 6 muestra la actividad inhibidora de los compuestos a 10  $\mu M$  expresada como el porcentaje de aumento del lag phase (tiempo que se requiere para que se inicie la reacción de formación de dienos conjugados) con respecto al control.
- 10
- 15
- 20
- 25

Tabla 6

Inhibición de oxidación LDL	
Compuesto	% de incremento del lag phase con respecto al control (media $\pm$ s.e.m.)
Isosorbida 5-mononitrato	0
(1)	290 $\pm$ 8
(12)	117 $\pm$ 56

### Inhibición de oxidación de plasma

El método utilizado en los ensayos para determinar el efecto de los compuestos

- 5 sobre la capacidad de oxidación del plasma es sustancialmente igual al descrito en Spranger T. et al., Chem Phys Lipids 1998; 91: 39-52.

La oxidación de lipoproteínas inducida *in vitro* en la matriz plasmática pretende representar un modelo relevante de la oxidación de lipoproteínas en la pared arterial. La oxidación de las lipoproteínas fue evaluada como la capacidad de oxidación del plasma heparinizado y se midió mediante espectrofotometría como un aumento en la absorbancia a 234 nm. Se añadieron los compuestos *in vitro* para determinar su actividad inhibidora sobre la capacidad de oxidación del plasma inducido por Cu<sup>2+</sup> (CuSO<sub>4</sub>). El plasma heparinizado fue diluido con solución salina 10 tampón fosfato (PBS) que contenía 0.16 M de NaCl y la oxidación se inició con 50 µM CuSO<sub>4</sub>. Se incubaron las muestras experimentales a 37°C y el aumento en la absorbancia a 234 nm fue registrado automáticamente cada 15 minutos durante al menos 12 h. El efecto de los compuestos sobre la capacidad de oxidación del plasma inducido por Cu<sup>2+</sup> fue sometido a ensayo a 7 concentraciones diferentes 15 utilizando plasma heparinizado de 7 donantes sanos diferentes. La tabla 7 muestra la actividad inhibidora de los compuestos a 10 µM expresada como el porcentaje de aumento del lag phase con respecto al control.

20

Tabla 7

25

Inhibición de oxidación de plasma	
Compuesto	% de incremento del laga phase con respecto al control (media ± s.e.m.)
(1)	245 ± 26
(2)	7 ± 1
(12)	200 ± 10
Isosorbida 5-mononitrato	0

Efecto preventivo y curativo sobre la aterogénesis en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol

El método utilizado es sustancialmente igual al descrito por Shore B, Shore V. en: Day CE (ed) Atherosclerosis Drug Discovery, Plenum Press, New York and London, pp 123-141, 1976.

- 5 Se mantuvieron veintiún machos de conejo blanco de Nueva Zelanda (de 10 semanas de edad al principio del protocolo) bajo condiciones estándar (22°C, 40% a 60% de humedad) con ciclos día / noche regulares y acceso libre a agua. Los animales fueron asignados a uno de los 3 grupos de manera aleatoria. El grupo 1 (n=5) recibió una dieta de mantenimiento estándar durante 75 días; el grupo 2 (n=16) recibió la misma dieta pero con un suplemento del 1% (peso/peso) de colesterol durante 45 días. Al final de este periodo, se dividió el grupo 2 en dos grupos aleatorios. El grupo tratado (n=9) recibió durante otros 30 días 1,9 mg/kg/día del compuesto 12 (manteniendo el 1% de colesterol en su dieta) y el grupo no tratado (n=7) recibió una dieta con un 1% de colesterol durante otros 30 días.
- Las variables del estudio incluían triglicéridos y colesterol total. Los animales fueron sacrificados al día 75 tras el inicio del protocolo con pentobarbital i.v. Se extrajo la aorta completa hasta 1 o 2 cm de las arterias iliacas y se fijó en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) conteniendo 4% de glutaraldehido. Los análisis macroscópico y microscópico de las muestras se llevaron a cabo de manera ciega. Se diseccionaron las aortas y se tiñeron con Red Oil. Se eliminó la grasa adventicia y se abrieron las aortas longitudinalmente, se sumergieron en una solución de Red oil durante la noche, se lavaron con propilenglicol y se fijaron sobre una superficie plana. Se tomaron imágenes de las aortas con una cámara estándar. Posteriormente, se tomaron tres secciones de la zona del arco aórtico, la aorta torácica y la aorta abdominal (orificios renales). Se fijaron las secciones con parafina, se cortaron con un micrótomo Ultracut (Spain) y se tiñeron de forma convencional con hematosilina eosina. Se tomaron imágenes de las aortas teñidas con Red Oil y hematosilina eosina con una cámara estándar. Se importaron dichas imágenes a la aplicación Photoshop (Adobe) mediante un escáner de diapositivas AGFA. Mediante el procedimiento previamente descrito por Lillie RD (Lillie, R.D., 1994, Stain Technology, vol. 19, pp 55) se determinó la superficie de lesión en toda la aorta y el grosor de la íntima en cortes histológicos. La superficie ó área de la lesión arteriosclerótica (evaluada a partir de las aortas teñidas con el Red Oil) se determina por el número de píxeles de la imagen convertidos a mm<sup>2</sup>. El grosor de

- la íntima arterial (evaluado a partir de las muestras histológicas teñidas con Hematosilina-Eosina) se cuantificó en mm<sup>2</sup> de forma similar a como se describe para la superficie o área de la lesión aterosclerótica. Para ello, se seleccionaron las secciones que contenían lesiones de estrias grasas y se determinó el grosor de la íntima (desde la media arterial hasta el endotelio). El grosor medio de la zona de lesión fue evaluado en secciones representativas por cuadrante aórtico y se calculó la media estadística.
- La tabla 8 muestra los niveles plasmáticos en ayunas de el colesterol total , el colesterol HDL y de triglicéridos. El examen estadístico (t de Student) no reveló diferencia significativa alguna entre el grupo medicado y el grupo control (el grupo no medicado pero con dieta alta en colesterol) en lo que respecta a los lípidos plasmáticos.

15 Tabla 8

Perfil de lípidos plasmáticos [mg/dl] (media ± s.e.m.)				
	Control		Tratado con el ejemplo del compuesto (12)	
	Basal	Final	Basal	Final
Colesterol total	42 ± 4.4	1073.9 ± 4.9	33.3 ± 4.1	1461 ± 147
Triglicéridos	185 ± 50	312.7 ± 130	121 ± 34	347 ± 82

El porcentaje de superficie cubierta por lesión ateroscleróticas se muestran en la tabla 9.

Tabla 9

Lesiones arterioscleróticas	
Grupo	Porcentaje de área de lesiones arterioscleróticas (%) (media $\pm$ s.e.m.)
Control	62 $\pm$ 6
Tratado con el ejemplo de compuesto (12)	15 $\pm$ 3

- 5 El grosor de la capa de íntima de la aorta se muestra en la tabla 10.

Tabla 10

Grosor de la capa de íntima de la aorta	
Grupo	Grosor mm <sup>2</sup> (media $\pm$ s.e.m.)
Control	0.323 $\pm$ 0.013
Tratado con el ejemplo de compuesto (12)	0.096 $\pm$ 0.009

10

En la tabla 8 se muestra que no existía diferencia alguna en los lípidos plasmáticos entre el grupo de control y el medicado, por lo que se demuestra que el compuesto (12) no tuvo influencia alguna sobre el metabolismo de lípidos. Tal y como se puede ver en la tabla 9 y en la tabla 10, tanto el porcentaje de área de las lesiones

15 ateroscleróticas como el grosor de íntima fueron reducidos significativamente en el grupo tratado con el compuesto (12) en comparación con el grupo de control.

#### Efecto preventivo y curativo en aterogénesis en ratón deficiente de apo E.

20 El efecto preventivo y terapéutico de los presentes compuestos sobre la aterosclerosis también se ilustrará a través del siguiente ejemplo.

El efecto preventivo y curativo de la aterogénesis de los compuestos se investigó en el modelo de ratón deficiente de apo E alimentado con dieta estándar. Se

alimentó ratones hembras y machos con deficiencia de apo E (OLA129X C57/BL6J) de tres meses de edad con dieta estándar. El grupo control incluía 8 ratones machos y 7 ratones hembras, mientras que el grupo tratado consistía en 8 ratones machos y 7 ratones hembras. Todos los animales tenían niveles de colesterol y peso corporal similares al comienzo del experimento. Tanto el grupo de control como el tratado fueron estudiados durante 12 semanas. El grupo de control recibió 5 mg/Kg/día del compuesto (12).

Los parámetros de lípidos plasmáticos (colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos) y el estrés oxidativo (medido como niveles de 8-iso-prostaglandina F<sub>2α</sub>) fueron medidos a intervalos predeterminados. Tras la finalización del periodo de administración, la aorta torácica fue aislada y teñidas para determinar el área de las lesiones ateroscleróticas depositadas en la pared interna del vaso sanguíneo de acuerdo con el método de Red Oil (Lillie, R.D., 1994, Stain Technology, vol. 19, pp 15 55).

Los niveles plasmáticos en ayunas de el colesterol total , el colesterol HDL, los triglicéridos y los niveles de 8-iso-prostaglandina F<sub>2α</sub>- se muestran en la tabla 11.

Tabla 11

20

(media ± s.d.)				
	Macho		Hembra	
	Control	Tratado con compuesto (12)	Control	Tratado con compuesto (12)
Colesterol total (mmol.L-1)	14.3 ± 2	18 ± 3	9.5 ± 2	11.3 ± 1.5
Colesterol HDL (mmol.L-1)	0.5 ± 0.15	0.47 ± 0.15	0.4 ± 0.1	0.48 ± 0.13
Triglicéridos (mmol.L-1)	2.6 ± 0.6	1.5 ± 0.4	1.9 ± 0.6	1.3 ± 0.2
8-iso-prostaglandina F <sub>2α</sub> (pg.mL-1)	273 ± 19	101 ± 13	182 ± 19	99 ± 7

El porcentaje de superficie ó área cubierto por las lesiones ateroscleróticas depositadas en la pared interna del vaso sanguíneo y el área cubierta con macrófagos se muestran en la tabla 12.

5

Tabla 12

Grupo	Área cubierta con macrófagos [ $\mu\text{m}^2$ ] (average $\pm$ s.e.m.)	Área de lesiones ateroscleróticas [ $\mu\text{m}^2$ ] (media $\pm$ s.e.m.)
Control	80 $\pm$ 27	60 $\pm$ 8
Tratado con ejemplo de compuesto (12)	55 $\pm$ 19	45 $\pm$ 9

- 10 En la tabla 11 se muestra que el compuesto (12) es capaz de descender los niveles de triglicéridos en el plasma, así como el estrés oxidativo de estos animales. En la tabla 12 se muestra cómo el compuesto (12) reduce tanto el área de lesiones arterioscleróticas como el área cubierta con macrófagos.

#### Efecto antitrombótico *in vivo*

15

El método utilizado es sustancialmente igual al descrito por Kurz (Kurz K.D., et al., Thromb. Res. 1990, 60:269-280) y modificado por Feuerstein (Feuerstein G.Z., et al., Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999, 19: 2554-25562).

20

Las ratas recibieron una única dosis oral de 100 mg/Kg de los compuestos.

25

Cuarenta y cinco minutos después de administrarse la dosis, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) y fueron colocadas posteriormente de manera dorsal sobre una mesa quirúrgica calentada (37°C).

Se aisló la arteria carótida izquierda y se colocó bajo ésta una lámina de Parafilm M (7 x 20 mm, American National Can). Se colocó una sonda electromagnética de flujo(Transonic Systems Inc.) en la arteria para medir el flujo de sangre.

Sesenta minutos tras la administración del producto, se colocó (y no se retiró durante todo el experimento) un parche de papel de filtro saturado con una solución de FeCl<sub>3</sub> (70%) sobre la arteria carótida izquierda y distal a de la sonda de flujo para iniciar la trombosis. Se controló el flujo de sangre durante los 60 min posteriores a 5 la aplicación del parche en la arteria.

Se consideró que el vaso se había ocluido totalmente por el trombo formado cuando se detectó ausencia del flujo sanguíneo (0,0 ml/min). En este modelo, la formación de trombos oclusivos normalmente tiene lugar en un plazo de 15 o 20 minutos 10 en animales no tratados. Se consideró que un animal estaba totalmente protegido por el tratamiento si un trombo no ocluía el vaso durante el periodo de estudio (60 min tras la aplicación continua del parche de FeCl<sub>3</sub>). 15

Los resultados se muestran en la tabla 13 y se expresan como el porcentaje de 20 animales totalmente protegidos por el tratamiento.

Tabla 13

Actividad antitrombótica en vivo	
Compuesto	% de animales totalmente protegidos
1	100
3	100
4	80
12	71

Como puede observarse en la tabla 13, todos los compuestos sometidos a ensayo tienen una potente actividad antitrombótica en vivo.

25

#### Efecto antitrombótico sinergístico in vivo

El método utilizado es sustancialmente igual al descrito por Kurz (Kurz K.D., et al., Thromb. Res. 1990, 60: 269-280) y modificado por Feuerstein (Feuerstein G.Z., et 30 al., Artherioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999, 19: 2554-25562).

Las ratas recibieron una única dosis oral o la combinación de dos compuestos, tal y como se describe en la tabla 14. las dosis de los compuestos utilizados no modificaron la presión arterial o la frecuencia cardiaca de los animales.

5

Cuarenta y cinco minutos después de administrarse la dosis, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) y fueron colocadas posteriormente de manera dorsal sobre una mesa quirúrgica calentada (37°C).

- 10 Se aisló la arteria carótida izquierda y se colocó bajo ésta una lámina de Parafilm M (7 x 20 mm, American National Can). Se colocó una sonda electromagnética de flujo(Transonic Systems Inc.) en la arteria para medir el flujo de sangre.
- 15 Sesenta minutos tras la administración del producto, se colocó (y no se retiró durante todo el experimento) un parche de papel de filtro saturado con una solución de FeCl<sub>3</sub> (70%) sobre la arteria carótida izquierda y distal a la sonda de flujo para iniciar la trombosis. Se controló el flujo de sangre durante los 60 min posteriores a la aplicación del parche en la arteria.
- 20 Se consideró que el vaso se había ocluido por el trombo formado cuando se detectó ausencia de flujo sanguíneo (0,0 ml/min). En este modelo, la formación de trombos oclusivos normalmente tiene lugar en un plazo de 15 o 20 minutos en animales no tratados. Se consideró que un animal estaba totalmente protegido por el tratamiento si un trombo no ocluía el vaso durante el periodo de estudio (60 min tras la aplicación del parche de FeCl<sub>3</sub>).
- 25

El concepto de producto fraccional fue utilizado para identificar la sinergia entre los compuestos. De acuerdo con este concepto, si consideramos la protección completa de un animal como:

30

$$\text{Inhibición fraccional} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

Donde A es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo tratado y B es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo de control

35

Para dos fármacos que actúan de manera independiente:

$$\text{Inhibición fraccional} = \left[ 1 - \left( \frac{A_1}{B} \times \frac{A_2}{B} \right) \right] \times 100$$

- 5 donde  $A_1$  es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo de tratamiento  $A_1$ ;  $A_2$  es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo de tratamiento  $A_2$ ; y  $B$  es la tasa de animales con oclusión trombótica en el grupo de control

- Si la protección obtenida con la combinación de los fármacos es superior a la inhibición fraccional para dos compuestos actuando de manera independiente, entonces se considera que el sinergismo tiene lugar.

Los resultados se muestran en la tabla 14 y se expresan como la tasa de animales con oclusión trombótica en cada grupo.

15

Tabla 14

Grupo	Tasa de animales con oclusión trombótica (% de animales protegidos)
Control	1 (0%)
Aspirina (100 mg/Kg/día, oral, durante 3 días)	0.50 (50%)
Compuesto 12 (22.3 mg/Kg, oral, agudo el día de estudio)	0.5 (50%)
Aspirina (100 mg/Kg/día, oral durante 3 días) + compuesto 12 (22.3 mg/Kg, oral, agudo el día de estudio)	0 (100%)
Clopidogrel (1.5 mg/Kg/día, oral durante 3 días)	0.50 (50%)
Clopidogrel (1.5 mg/Kg/día, oral durante 3 días)+ compuesto 12 (22.3 mg/Kg, oral, agudo el día de estudio)	0.17 (83%)

Inhibición fraccional (aspirina + compuesto 12) =

$$\left[ 1 - \left( \frac{0.5}{1} \times \frac{0.5}{1} \right) \right] \times 100 = 75\%$$

- 5 Dado que el porcentaje de animales protegido con la combinación de los dos fármacos (aspirina + compuesto 12) es superior al 75% (es de un 100%) existe un sinergismo entre los dos productos.

10 Inhibición fraccional (clopidogrel + compuesto (12)) =

$$\left[ 1 - \left( \frac{0.5}{1} \times \frac{0.5}{1} \right) \right] \times 100 = 75\%$$

- 15 Dado que el porcentaje de animales protegido con la combinación de los dos fármacos (clopidogrel + compuesto 12) es superior al 75% (es de un 83%) existe un sinergismo entre los dos productos.

20 **Protección in vitro contra la citotoxicidad inducida por radicales de oxígeno utilizando el método basado en XTT en células HUVEC.**

El método utilizado es sustancialmente igual al descrito por Caveda L., et al. (J. Clin. Invest. 1996; 98: 886-893).

- 25 Para la determinación de la capacidad de inhibir la citotoxicidad inducida por radicales de oxígeno, se utilizaron Células Endoteliales Umbilicales Humanas (HUVEC). Se aislaron las HUVEC y se cultivaron en M199 y 20% FCS (Fetal Calf Serum).

- 30 El ensayo XTT se basa en la hidrólisis por las células metabólicamente activas de la sal de tetrazolio XTT para formar un producto anaranjado (formazan) . El formazan formado es soluble y se cuantifica directamente mediante espectrofotometría.

Las células HUVEC fueron cultivadas hasta un estado de sub-confluencia en una placa de cultivo de 96 pocillos y fueron pretratadas con 50 µM del compuesto du-

rante una hora. Tras ello, las células fueron tratadas con 800 $\mu$ M de peroxinitrito durante toda la noche.

Tras la incubación nocturna, las células fueron incubadas con la solución amarilla

- 5 XTT (concentración final 0.3 mg/ml) durante 4 horas. Tras este periodo de incubación, se formó la solución de formazan , la cual fue cuantificada espectrofotométricamente a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA .

- 10 Los resultados se muestran en la tabla 15 y se expresan como el porcentaje de células muertas.

Tabla 15

Actividad citoprotectora in vitro	
Compuesto	% de células muertas
1	80
2	80
3	80
12	50

- 15 Como puede observarse en la tabla 15, todos los compuestos sometidos a ensayo tienen una actividad protectora ( $p<0,05$ ) de la célula contra daños celulares inducidos por radicales de oxígeno.

20 **Protección in vivo contra daños coronarios por isquemia – reperfusión.**

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el modelo de rata descrito previamente por Hirata Y et al (Journal of Cardiovascular Pharmacology. 1998, 31: 322-326)

- 25 Tras un periodo de ayuno alimenticio de 6 horas, los animales fueron divididos en grupos de al menos 8 animales cada uno.  
Las dosis de productos se administraron mediante sonda oral 1 hora antes de la inducción de la isquemia. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (40

- mg/kg, i.p.) y se registró el electrocardiograma de la derivación estándar II para detectar la depresión de la onda S. Se inyectaron 0.3U/kg de arginina-vasopresina (AVP) (Sigma Chemicals, St Louis, Mo, USA) en la arteria carótida para inducir la vasoconstricción de arterias coronarias pequeñas y el aumento de la resistencia
- 5 coronaria. Los grupos tratados recibieron AVP 60 min después del fármaco de ensayo. En todos los grupos, tras la inyección de AVP, se efectuó un registro de ECG de 10 minutos.
- 10 Los resultados se muestran en la tabla 16 y se expresan como decrementos de la onda S ( $\mu$ voltos).

Tabla 16

15

Compuesto	Dosis(mg/kg,p.o.)	Decremento de onda S( $\mu$ V)	Protección del decremento de onda S(%)
Vehículo	-	46.2 $\pm$ 4.9	-
12	20	22.6 $\pm$ 5.9	52
12	100	8.6 $\pm$ 2.8	81
9	20	16.5 $\pm$ 9.8	64
9	100	9.7 $\pm$ 4.6	79
4	20	36.5 $\pm$ 11.6	21
4	100	5.9 $\pm$ 3.9	87

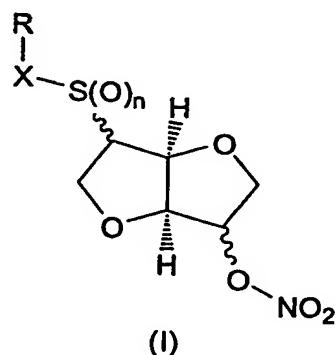
Como puede observarse en la tabla 16, todos los compuestos sometidos a ensayo protegen contra el daño cardíaco por isquemia – reperfusión.

20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

5



(I)

donde

n es un número entero de entre 0, 1, o 2,

10

X representa  $-S(O)_m^-$ ,  $-(C=O)-$  o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, o 2,

y R representa hidrógeno o un residuo de entre los siguientes:

15

C<sub>1-6</sub> alquilo;

C<sub>2-6</sub> alquenilo;

C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;

C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;

C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;

20

C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es sustituido por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;

fenilo;

piridilo;

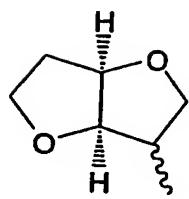
tiofenilo;

25

nitrosilo;

S-cisteinil;

S-glutationil; y



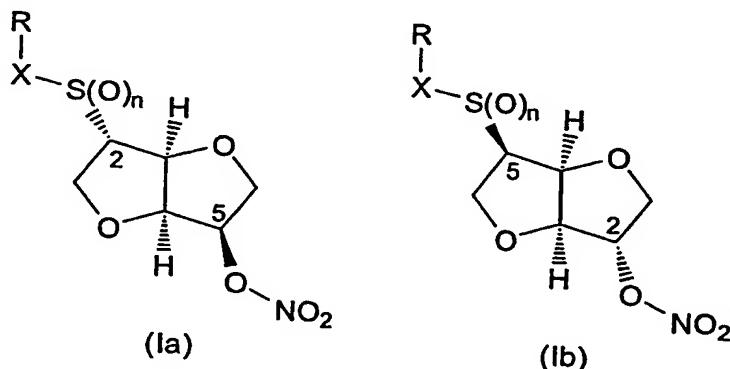
y este último residuo puede estar opcionalmente sustituido hasta por tres grupos independientes seleccionados de entre C<sub>1</sub>-6 alquilo, C<sub>2</sub>-6 alquenilo,

- 5 C<sub>3</sub>-8 cicloalquilo, C<sub>4</sub>-8 cicloalquelino, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno.

Siempre que

Cuando RXS(O)<sub>n</sub>- y -ONO<sub>2</sub> estén en forma trans uno respecto al otro, en lo que respecta al plano de anillo, tal y como se describe en las fórmulas (Ia) y (Ib):

10



entonces RXS(O)<sub>n</sub>- no representa Z-C(=O)-S—, donde Z es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-4,

- 15 grupo arilo o grupo aralquilo, el cual puede estar eventualmente sustituido.

2. Un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde m, n o ambos sea 0.

- 20 3. Un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde X represente un enlace sencillo o -S-.

4. Un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R represente hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo)C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo) C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, fenilo o  
5 (C<sub>1-6</sub> alquilo)fenilo.
5. Un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R sea C<sub>1-6</sub> alquilo.  
10
6. Un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 , seleccionado de entre:  
15      2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
          5,5'-dinitrato-2,2'-ditio-diisosorbida,  
          2-metiltioisosorbida 5-mononitrato,  
          2-metilsulfinilisosorbida 5-mononitrato,  
          2-metilsulfoniilosorbida 5-mononitrato,  
20      S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
          2-(tetrahidropirano-2-il-tio)-isosorbida 5-mononitrato,  
          2-(isosorbidil-2'-ditio)-isosorbida 5-mononitrato,  
          y  
          2-(5'-acetiloxiisosorbidil-2'-ditio)-isosorbida 5-mono  
25      nitrato.
7. Una composición farmacéutica que contenga al menos un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 , como ingrediente(s) activo(s), opcionalmente  
30 junto con uno o más excipiente(s), activador(es), agente(s) quelante(s) y/o estabilizador(es) fisiológicamente aceptables.
8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 que además contenga un trombolítico, preferentemente un activador del plasminógeno, uroquina,  
35 estreptoquinasa, alteplasa o anistreplasa.

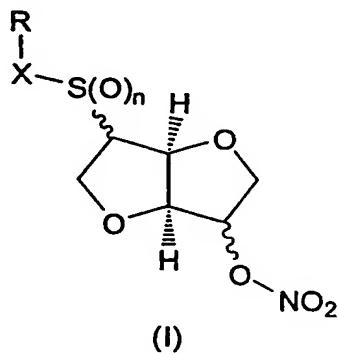
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que además contenga un anticoagulante, preferentemente heparina, dicumarol, acenocumarol, enoxaparina o polisulfato de pentosano.
- 5    10. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 , que además contenga un anti trombótico, preferentemente aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidrogel, triflusal, polisulfato de pentosano o abciximab.
- 10    11. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 , que además contenga una inmunoglobulina o un fragmento de ésta con especificidad para la glicoproteína IIb/IIIa.
- 15    12. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 , que además contenga un hipolipemiantre, preferentemente simvastatina, lovastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, lifibrol, acifrán, acitemato o glunicato.
- 20    13. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 , que además contenga un antioxidante / secuestrador de radicales libres, preferentemente seleccionado de entre nicaravén, ranolazina, emoxipina, glutationa, edaravona, raxofelast, licopene, acetilcisteina, N-Acetil-L-cisteina, N-acetilcisteina o carvedilol.
- 25    14. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, disfunciones del sistema circulatorio, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia – reperfusión.
- 30    15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 para la prevención y/o tratamiento de condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis tales como, pero no limitadas a

ellas, alergias, ictus, enfermedad de Alzheimer y enfermedades isquémicas cardio-vasculares.

16. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, para el tratamiento y/o prevención de disfunciones del sistema circulatorio, preferentemente disfunción cardiovascular y/o coronaria.

17. El uso de al menos un compuesto de la fórmula (I) o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo:

10



(I)

donde

n es un número entero de entre 0, 1, o 2,

15

X representa  $-S(O)_m-$ ,  $-(C=O)-$  o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, o 2,

y R representa hidrógeno o un residuo seleccionado de entre:

20

C<sub>1-6</sub> alquilo;

C<sub>2-6</sub> alquenilo;

C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;

C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;

25

C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;

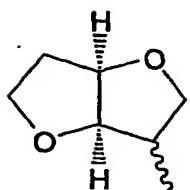
C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;

fenilo;

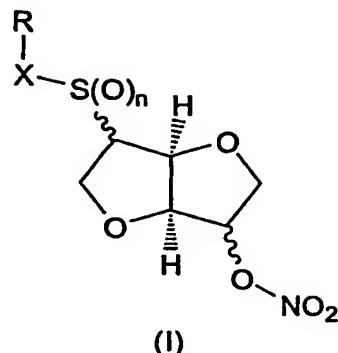
piridilo;

tiofenilo;  
nitrosilo;  
S-cisteinil;  
S-glutationil; y

5



- y este último residuo puede estar opcionalmente sustituido hasta por tres grupos independientes seleccionados de entre C1-6 alquilo, C2-6 alquenilo,  
10 C3-8 cicloalquilo, C4-8 cicloalquelino, acetiloxi, hidroxilo , ONO<sub>2</sub> y halógeno  
como un ingrediente activo para la fabricación de composiciones farmacéuticas para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, disfunciones del sistema circulatorio, activación de plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o el daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia – reperfusión.  
20 18. El uso de al menos un compuesto de la fórmula (I) o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo como un ingrediente activo para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis, disfunciones endoteliales, espasmos vasculares, vasculopatía del trasplante alogénico, disfunciones del sistema circulatorio, activación de  
25 plaquetas, trombosis, ictus, condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo desempeña un importante papel en su patogénesis, condiciones patológicas en las que el déficit de óxido nítrico desempeña un papel importante en su patogénesis, y/o el daño tisular debido a isquemia y/o debido a isquemia – reperfusión, que incluya la administración de dicho compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un paciente que lo necesite:  
30



donde

n es un número entero de entre 0, 1, o 2,

5

X representa  $-S(O)_m-$ ,  $-(C=O)-$  o un enlace sencillo, donde m es un número entero de entre 0, 1, o 2,

y R representa hidrógeno o un residuo seleccionado de entre:

10

C<sub>1-6</sub> alquilo;

C<sub>2-6</sub> alquenilo;

C<sub>3-8</sub> cicloalquilo;

C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;

15

C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo;

C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, donde un grupo CH<sub>2</sub> es reemplazado por O, S, NH o NCH<sub>3</sub>;

fenilo;

piridilo;

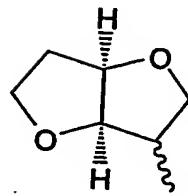
20

tiofenilo;

nitrosilo;

S-cisteinil;

S-glutationil; y

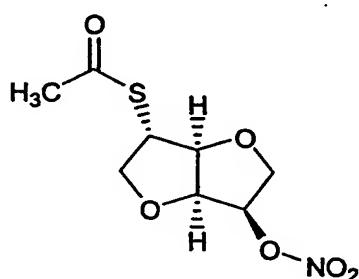


- y este último residuo puede estar opcionalmente sustituido hasta por tres grupos independientes seleccionados de entre C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquelino, acetiloxi, hidroxilo, ONO<sub>2</sub> y halógeno.
- 5      19. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 17 o 18, donde m, n o ambas sea 0.
- 10     20. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 , donde X represente un enlace sencillo o -S-.
- 15     21. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, donde R presente hidrógeno, C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>2-6</sub> alquenilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo)C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, (C<sub>1-6</sub> alquilo) C<sub>4-8</sub> cicloalquenilo, fenil o (C<sub>1-6</sub> alquilo)fenilo.
22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21 ,donde R sea C<sub>1-6</sub> alquilo.
- 20     23. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, donde el compuesto se selecciona de entre:
- 25     2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
      5,5'-dinitrato-2,2'-ditio-diisosorbida,  
      2-metiltioisosorbida 5-mononitrato,  
      2-metilsulfinilisosorbida 5-mononitrato,  
      2-metilsulfonilisosorbida 5-mononitrato,  
      S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato,  
      2-(tetrahidropirano-2-il-tio)-isosorbida 5-mononitrato,  
30     2-(isosorbidil-2'-ditio)-isosorbida 5-mononitrato,  
      y  
      2-(5'-acetiloxiisosorbidil-2'-ditio)-isosorbida 5-mono

nitrato.

24. El uso de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, donde el compuesto es acetil-tioisosorbida 5-mononitrato, que se representa mediante la siguiente fórmula:

5



25. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, donde la composición farmacéutica también incluya un trombolítico, preferentemente un activador del plasminógeno, uroquinasa, estreptoquinasa, alteplasa o anistreplasa.

10

26. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, donde la composición farmacéutica también incluya un anticoagulante, preferentemente heparina, dicumarol, acenocumarol, enoxaparina o polisulfato de pentosano.

15

27. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, donde la composición farmacéutica además contenga un antitrombótico, preferentemente aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidrogel, trifusal, polisulfato de pentosano o abciximab.

20

28. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, donde la composición farmacéutica además contenga inmunoglobulina o un fragmento de ésta con especificidad por la glicoproteína IIb/IIIa.

25

29. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, donde la composición farmacéutica además contenga un hipolipemiante, preferentemente simvastatina, lovastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, lifibrol, acifrán, acitemato o glunicato.

30. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 29, donde la composición farmacéutica también contenga un antioxidante / secuestrador de radicales libres, preferentemente seleccionado de entre nicaravén, ranolazina, emoxipina, glutationa, edaravona, raxofelast, licopene, acetilcisteina, N-Acetil-L-cisteina, N-acetilcisteina o carvedilol.

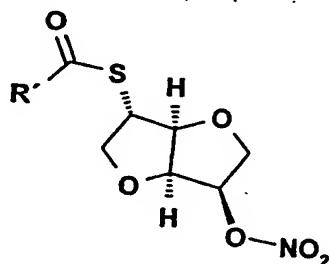
5

10

31. Un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (I) o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprenda los siguientes pasos:

a) efectuar una hidrólisis de un compuesto de la fórmula

II:



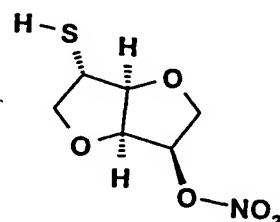
15

20

donde R' es C<sub>1-6</sub> alquilo, preferentemente metilo,

para obtener 2-tiosorbida 5-mononitrato (1),

25



30

y

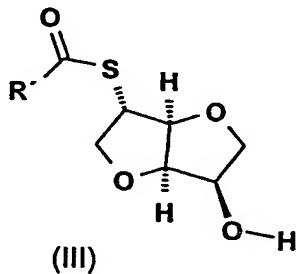
(1)

35

b) opcionalmente, efectuar sobre el compuesto (1) preparado de acuerdo con el paso a):

- 5 I. Una oxidación para obtener 5,5'-dinitrato-2,2'-ditio-diisosorbida (2) o 2-(isosorbidil-2'-ditio)-isosorbida 5-mononitrato (8), o  
II. Una alquilación o arilación para obtener 2-(alquilo o arilo)tioisosorbida 5-mononitrato; opcionalmente seguido por una oxidación para obtener 2-(alquilo o arilo) sulfinil-isosorbida 5-mononitrato o 2-(alquilo o arilo)-sulfonil-isosorbida 5-mononitrato, o  
III. Una nitrosación para obtener S-nitroso-2-tioisosorbida 5-mononitrato (6).
- 10 32. Un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que contenga los siguientes pasos:  
a) efectuar una oxidación de un compuesto de la fórmula III:

15



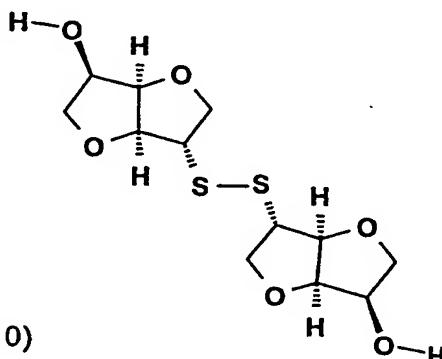
(III)

20

donde R' es C<sub>1-6</sub> alquilo, preferentemente metilo,

para obtener 2,2'-ditio-diisosorbida(10),

25



(10)

y

35

b) efectuar una nitración con un agente nitrante en presencia de un anhídrido carboxílico, preferentemente anhídrido acético, del compuesto preparado en el paso a) para obtener 2-(5'-aciloxi-isosorbidil-2'-ditio)-isosorbida 5-mononitrato (11).

5

33. Un compuesto que sea 2,2'-ditio-diisosorbida.

:: 1 Document Name: untitled

seen : PC0641M  
1 : PC0641M0

C A S P I A  
Special informations

20 Dec 2004 17:42

\ Number : EP \_ 4 10882

az	Num	Pub Date	Ind	List Date	Repub	With	Updated by	
						22 Oct 2004	Norbert RIGHET	
Ty.		Date.Pub		Pub.Num	Gaz.Num	---->	22 Oct 2004	
1.	A2	Due on	03 Apr 2005					2 2
	Started		Days	From To	Operation	?	OK,	
	26 Oct 2004	15:28:12	55	NRI 11L1	STANDARD	?	error	
	22 Oct 2004	11:34:01	4	NRI NRI	NEW			

-----  
Inter-PF1---PF2---PF3---PF4---PF5---PF6---PF7---PF8---PF9---PF10--PF11--PF12---  
Help End Sumry Cmnd

PCT/EP2004/010882

